

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA
Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón
Castroviejo
Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología



TESIS DOCTORAL

**Implicación de la Glía Retiniana en un modelo experimental del
glaucoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Isabel Gallego Collado

Directores

**Ana Isabel Ramírez Sebastián
Juan José Salazar Corral**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA
Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo
Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología



TESIS DOCTORAL

**Implicación de la Glía Retiniana en un modelo experimental del
glaucoma**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Beatriz Isabel Gallego Collado

Directores

**Ana Isabel Ramírez Sebastián
Juan José Salazar Corral**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OFTALMOLÓGICAS

RAMÓN CASTROVIEJO

DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA Y ORL



**IMPLICACIÓN DE LA GLÍA RETINIANA EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA**

Beatriz Isabel Gallego Collado

Dirigida por: ***Prof. Dña. Ana Isabel Ramírez Sebastián***

Profesora Titular del Departamento de Oftalmología y ORL
Facultad de Óptica y Optometría
Universidad Complutense de Madrid

Prof. D. Juan José Salazar Corral

Profesor Titular del Departamento de Oftalmología y ORL
Facultad de Óptica y Optometría
Universidad Complutense de Madrid

Madrid 2014



Dña. **Ana Isabel Ramírez Sebastián**, Profesora Titular del Departamento de Oftalmología y ORL de la Facultad de Óptica y Optometría en la Universidad Complutense de Madrid

D. **Juan José Salazar Corral**, Profesor Titular del Departamento de Oftalmología y ORL de la Facultad de Óptica y Optometría en la Universidad Complutense de Madrid

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada ***“Implicación de la glía retiniana en un modelo experimental de glaucoma”***, realizada por Dña. **Beatriz Isabel Gallego Collado**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, para su evaluación y la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste donde fuera necesario, expiden y firman el presente certificado en Madrid a 3 de Abril de dos mil catorce.

Fdo. Prof. Ana I. Ramírez Sebastián

Fdo. Prof. Juan J. Salazar Corral



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**Esta tesis ha sido financiada por
Becas Predoctorales Complutense. Formación de Personal Investigador**



"Una manera de hacer Europa"

Tesis doctoral acreditada por OFTALRED. RETICS Patología Ocular
**"Enfermedades oculares: prevención, detección precoz y tratamiento de la
patología prevalente degenerativa y crónica"**

A todos aquellos que sienten suyo un trocito de este proyecto, mi proyecto

Agradecimientos

Después de tantas veces que os he dicho “nada, ya no me queda casi nada” ahora por fin tengo el placer de deciros “ahora sí, la he terminado”. Dichosa preguntita la de “¿y la tesis cómo va?”, ante la que mi respuesta era “¿la tesis?, esto no se va a terminar nunca” “¿la tesis?, una de dos, o acabo yo con ella o ella conmigo”, pero YA ESTÁ. Aunque ha habido momentos menos divertidos, para qué engañarnos, todos quedan sepultados a miles de metros bajo tierra gracias a la lluvia de recuerdos buenos que vienen a mi mente cuando pienso en los últimos años aquí en “esta nuestra casa”. Y volviendo a la pregunta de “¿y la tesis cómo va?”, si he de ser sincera también ha sido el impulso que cada día ha hecho que le diera otro empujón más a este trabajo. Por hacerme abrir los ojos gracias:

Ana I. Ramírez Sebastián, por ser mi mano madre en la ciencia, por darme tu mano amiga durante estos años. Sólo deseo haberme contagiado de tu constancia, de tu pasión e ilusión por las cosas bien hechas.

Juan José Salazar Corral, por cada vez que venías y me decías “mira becaria otro articulito nuevo de glaucoma”. Gracias por tantas horas delante de un ordenador que han hecho más fáciles las horas de trabajo. Gracias por saber escuchar y entender las necesidades de todos.

A vosotros, pareja de dos, **José Manuel Ramírez Sebastián y Alberto Triviño Casado**, sin los que “veneno” no habría pasado a la historia. Por las historias de antaño, por la “Quina Santa Catalina”, por las risas, las regañinas al “pedazo de atún”, el regalo de la experiencia, la humildad, la sencillez y lo más importante, por vuestro cariño.

Mi **Blanca Rojas López**, gracias por ser una persona con un corazón inmensamente generoso. Gracias por probarte mis zapatos y enseñarme que la luz es cuestión de un “click” en el interruptor de la vida de cada uno. Y no te digo nada más, que sólo nos queda este año, debemos apurarnos y protegernos del sol de marzo, tú lo sabes todo.

Rosa de Hoz Montañana, gracias “doña Rosa” por saber cuándo y en qué lado de la mesa dar el puñetazo. Gracias por la sencillez, la alegría y por los consejos de “mama Rosa” durante todos estos años.

A ese relevo que se hizo esperar. **Isa**, gracias por tantas tardes de cafés y tesis bajo la melodía “es una lata el trabajar”. Gracias **Elena** por los chascarrillos y por obsequiarnos con muchos de los placeres de tu tierra, Extremadura. Y por último el escuadrón más joven; gracias a mi **Judith**, mi cabra loca saltarina, mi gitanilla que aporta luz, alegría y perspectiva a mis días, eres grande princesa; y a **Pilar**, nuestra “musicóloga”, gracias por tu dulzura.

A las enseñanzas de laboratorio de **Desi y Paqui** que han hecho que esta experiencia haya sido factible.

Gracias al resto del personal del Instituto, a **Julia**, por ese humor que nos regalas cuando consigues salir un momento de tu ardua tarea, y por apagarme las luces del despacho cuando considerabas que era hora de irse a casa, es lo malo de compartir luces; a **Vicky**, por ser mi “secre” favorita, no sólo por ir en busca de mis cápsulas de café que me han mantenido despierta, sino por estar dispuesta a regalarme su tiempo siempre con una sonrisa, incluso a las 14:01 h; **Isidoro**, gracias por ser siempre la primera sonrisa de la mañana; a **Silvia**, por tus palabras de cariño, ánimo y por hacerme sentir que uno mismo es el dueño de su destino, y la verdad es que eres mi rubia más divertida. **Eva** maña, gracias por poner “tomatico” a aquellos momentos que parecían ser “sintomatico”, con sabor la vida es más apetecible. **Pilar** gracias por las risas que han roto los momentos de monotonía. **Belén**, “niña” gracias por tener ganas de seguir aprendiendo, no te olvides de esas “chuletas” que siempre nos sacan de los apuros. **Charo**, gracias por creer que la optometría tiene algo más, por la ilusión que pones y por contagiarnos de ella.

Mi agradecimiento más emotico no puede ser sino para ti **Eugenia**, amiga, compañera, pero sobre todo MAMÁ. Tú que sin condiciones siempre has apostado por tu caballo ganador, a pesar de que a veces parecía perder las herraduras. Todo esto no es sino gracias a ti, a tu esfuerzo, sacrificio y dedicación a mi. Espero que lo disfrutes, es tuyo, te lo has ganado.

Gracias a ti **Mariano**, por confiar siempre en que tu “sobrina” encontraría la luz a través de las aristas de esos diamantes que tú y yo dejamos sin pulir.

Gracias al resto de mi familia, gracias simplemente por existir.

Pablo tú fuiste quien dio el pistoletazo de salida de esta maratón a la voz de “niña, claro que puedes”. Y ya ves, he podido. Gracias por creer en mi y enseñarme cómo hacerlo; siempre serás mi gran “maese”.

Maite, mi “Mari Tere”, **Carmen**, mi “Carmela”, mis dos chicas para todo. Las personas que regalan lo que tienen con el amor que lo hacéis vosotras dan la vida a quien lo recibe. Gracias por el regalo de vuestra amistad incondicional durante este tiempo, uno no sabe de dónde sale el camino, pero sí cómo decide seguirlo. Cuento con vosotras, contad conmigo.

Blanca Arango Gonzalez and **Michelle Dierstein**. I Thank you, “princesas”, for the most wonderful months during a period of changes in my life. Thank you for encouraging me to discover my potential, for your help, your patience and for being there for me as friends.

Tengo la gran fortuna de rodearme de grandes amigos a los que quiero; **Marina** querida “hermana”, gracias por simplemente dejarme saber que siempre estarás ahí, por regalarme tu amistad. Aunque llegue esta nueva y tan temida etapa para las dos, nunca allá donde vaya será suficientemente lejos como para perderme el regalo de nuestra unión “de sangre”. **Héctor**, gracias por ser mi hermano en la retaguardia. Aunque te pierdan las “mágicas” y los “warning” sé que eres el mejor marido del mundo, estoy feliz y tranquila por ello, gracias. **Su, Rober** gracias por hacerme sentir que lo que aún somos es ¡jóvenes!, quiero empezar a serlo de nuevo después de estos meses, ¿para cuándo ese vermut? ¿y ese cocido maragato?. Gracias a todos los demás que habéis estado en tierra siempre que he vuelto del exilio, gracias **Vanesa**, cuento contigo porque tendremos que seguir entonando juntas por muchos años eso de “no, no puede.....”. **Carlos, Adriana**, gracias por saber que puedo contar con dos más en la lista de amigos, seguiremos creciendo juntos. **Fran**, mi

“Paco”, gracias por ser pura bondad, no te olvides que el pincel con el que pintas la vida está en tu mano, yo puedo, yo decido, siempre.

Gracias **Markus** por llegar y saber abrirte paso en el momento en el que más ocupada me tenía esta tesis, qué ilusa, y yo que pensaba que te engañaba. Gracias por compartir conmigo este tiempo, tus “pequeñas” y grandes ilusiones, me ha encantado. Gracias por empujarme, a pesar del estrés, a hacer las cosas que “tenían que estar hechas hace dos semanas”. Ahora es tiempo de retomar también algo de dos semanas atrás, nuestra vida.

Las últimas palabras de agradecimiento son en general para todos vosotros, los que me habéis echado gasolina al coche cuando parecía ir cuesta arriba sin muchas ganas. Ya estoy aquí, estoy de vuelta, me reincorporo a la vida moderna, prepararos que vengo con fuerza. Gracias.

***“Preferiré siempre arrepentirme de lo
que hice que de lo que cobardemente
dejé por hacer”***

Abreviaturas y acrónimos

ACAID	Desviación Inmune Asociada a la Cámara Anterior
AR-GFAP	Área de retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+
DT	Desviación típica
P	p-valor
AR-Iba1	Área de retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
Ca²⁺	Ión calcio
CCG	Capa de células ganglionares
CFN	Capa de fibras del nervio óptico
CFR	Capa de fotorreceptores
CGRs	Células ganglionares de la retina
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CNTF	Factor de crecimiento ciliar
CO₂	Dióxido de carbono
CPA	Célula presentadora del antígeno
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
DTMR	Dextrano tetrametilrodamina
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ES	Espacio subretiniano
ET	Endotelina
FG	Fluoro-Gold
GABA	Ácido g-aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico de la línea celular glial
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H⁺	Protón

H₂O	Agua
HCO₃⁻	Ión Bicarbonato
HRP	Peroxidasa de rábano de caballo
HSP	Proteínas de sock térmico
HTO	Hipertensión ocular
Iba-1	Ionized calcium binding adapter molecule
IL	Interleucina
IR-GFAP	Inmunorreacción GFAP+
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MLE	Membrana limitante externa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLI	Membrana limitante interna
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
NFs	Neurofilamentos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NOS	Óxido nítrico sintasa
NTs	Neurotrofinas
OHSt	Metanosulfonato de hidroxistilbamidina
Ojos-HTO	Ojos con hipertensión ocular
ON	Óxido nítrico
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario de la retina
PIO	Presión intraocular
SNC	Sistema nervioso central
TGF-α	Factor transformante de crecimiento alfa
TGF-β	Factor transformante de crecimiento beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

Indice

RESUMEN	1
SUMMARY	17
ORGANIZACIÓN GENERAL DE LA TESIS	31
1 INTRODUCCIÓN	35
1.1 El sistema visual de los mamíferos	35
1.1.1 La retina	35
1.2 Células ganglionares de la retina	38
1.2.1 Generalidades	38
1.2.2 Marcadores de las células ganglionares de la retina	40
1.2.2.1 Trazadores neuronales específicos aplicados en el colículo superior o en el nervio óptico	40
1.2.2.2 Marcadores neuronales específicos	42
1.2.2.3 Marcadores axonales: anticuerpos contra los neurofilamentos	42
1.3 Células gliales	43
1.3.1 Antecedentes y generalidades	43
1.3.2 Células macrogliales de la retina: los astrocitos y las células de Müller	51
1.3.2.1 Astrocitos	51
1.3.2.1.1 Generalidades	51
1.3.2.1.2 Principales funciones de las células astrocitarias	53
1.3.2.1.2.1 Neurogénesis y sinaptogénesis	53
1.3.2.1.2.2 Formación de la barrera hematoencefálica o hematorretiniana	54
1.3.2.1.2.3 Regulación del metabolismo energético	55
1.3.2.1.2.4 Mantenimiento de la homeostasis extracelular	55
1.3.2.1.2.5 Modulación de la transmisión sináptica	57
1.3.2.1.2.6 Función neurotrófica	58
1.3.2.2 Células de Müller	59
1.3.2.2.1 Generalidades	59
1.3.2.2.2 Principales funciones de las células de Müller	62
1.3.2.2.2.1 Desarrollo embrionario de la retina	62
1.3.2.2.2.2 Formación de la barrera hematorretiniana	63
1.3.2.2.2.3 Regulación del metabolismo energético	63
1.3.2.2.2.4 Mantenimiento de la homeostasis extracelular	64
1.3.2.2.2.5 Transmisión de la señal nerviosa	66
1.3.2.2.2.6 Función neurotrófica	67
1.3.2.3 Marcadores de la población macroglial: anticuerpos específicos	68
1.3.3 Células microgliales	70
1.3.3.1 Generalidades	70
1.3.3.2 Tipos morfológicos de la población microglial y funciones asociadas	73

1.3.3.2.1	Periodo embrionario: microglía ameboide	73
1.3.3.2.2	Periodo postnatal: estado maduro	74
1.3.3.2.2.1	Microglía quiescente	75
1.3.3.2.2.2	Microglía hiperramificada	77
1.3.3.2.2.3	Microglía reactiva	78
1.3.3.2.2.4	Microglía fagocítica	81
1.3.3.2.2.5	Microglía distrófica	82
1.3.3.3	Marcadores de la población microglial	84
1.3.3.3.1	Técnicas histoquímicas enzimáticas	84
1.3.3.3.2	Técnicas histoquímicas con lectinas	85
1.3.3.3.3	Técnicas inmunohistoquímicas	85
1.3.4	Las células gliales en los procesos patológicos: activación glial	87
1.3.4.1	Cambios morfológicos de las células gliales	88
1.3.4.2	Proliferación de las células gliales	89
1.3.4.3	Producción de factores pro- y antiinflamatorios por las células gliales	91
1.3.4.4	Fagocitosis y presentación del antígeno de las células gliales	92
1.4	Neurodegeneración óptica glaucomatosa	95
1.4.1	Concepto y factores de riesgo	95
1.4.2	Fisiopatología de la neurodegeneración óptica glaucomatosa	97
1.4.2.1	Mecanismos primarios implicados en la patología glaucomatosa	98
1.4.2.1.1	Células ganglionares de la retina en respuesta a la presión intraocular	98
1.4.2.1.2	Células ganglionares de la retina en respuesta a la isquemia	100
1.4.2.1.3	La inflamación y las células ganglionares de la retina	102
1.4.2.2	Mecanismos secundarios implicados en la patología glaucomatosa	106
1.4.2.2.1	Deprivación de neurotrofinas y células ganglionares de la retina	106
1.4.2.2.2	Glutamato y células ganglionares de la retina	107
1.4.2.2.3	Radicales libres, óxido nítrico, endotelina-1 y células ganglionares de la retina	107
1.5	El ratón como modelo experimental	109
1.5.1	La retina de los ratones albinos	110
1.5.2	Modelos experimentales de hipertensión ocular en roedores	111
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	117
2.1	Justificación e hipótesis	117
2.2	Objetivos	118
2.2.1	Objetivos específicos	118
3	MATERIAL Y MÉTODOS	123
3.1	Animales de experimentación y anestesia	123
3.2	Caracterización del modelo de hipertensión ocular	124
3.2.1	Grupos experimentales	124
3.2.2	Inducción de la hipertensión ocular	125

3.2.3	Medida de la presión intraocular -----	126
3.3	Procesamiento de la muestra-----	127
3.3.1	Perfusión y fijación-----	127
3.3.2	Disección de las retinas para microscopía óptica. Montajes planos de retina-----	129
3.3.3	Procesamiento histológico de las retinas. Técnicas inmunohistoquímicas-----	130
3.3.3.1	Estudio de las poblaciones celulares y anticuerpos-----	130
3.3.3.2	Protocolo de inmunofluorescencia indirecta-----	133
3.4	Estudio morfométrico de la retina -----	135
3.4.1	Caracterización de la macroglía GFAP+ y de las células ganglionares de la retina NF-200+ -----	135
3.4.1.1	Generalidades del análisis -----	135
3.4.1.2	Análisis de las células ganglionares de la retina NF-200+y de los astrocitos GFAP+ -----	136
3.4.1.3	Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ -----	138
3.4.1.4	Intensidad de la inmunorreacción GFAP-----	139
3.4.2	Caracterización de las células Iba-1+-----	140
3.4.2.1	Generalidades del análisis -----	140
3.4.2.2	Análisis de las células Iba-1+: morfología, número y área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+-----	144
3.4.2.3	Dominios espaciales retinianos de las células Iba-1+-----	151
3.4.2.4	Expresión del CD68 en las células Iba-1+ -----	152
3.4.3	Expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en la glía retiniana -----	154
3.5	Análisis estadístico de la muestra -----	155
4	RESULTADOS -----	159
4.1	Inducción de la hipertensión ocular-----	159
4.2	Efecto de la hipertensión ocular en las células ganglionares de la retina NF-200+ -----	160
4.2.1	Análisis morfológico y cuantitativo de las células ganglionares de la retina NF-200+ -----	160
4.2.1.1	Grupo control de edad y ojos contralaterales no tratados -----	160
4.2.1.2	Ojos-HTO -----	162
4.3	Efecto de la hipertensión ocular en las células GFAP+ de la retina: astrocitos y células de Müller 163	
4.3.1	Descripción morfológica de las células GFAP+ -----	163
4.3.1.1	Grupo control de edad -----	163
4.3.1.2	Ojos contralaterales no tratados -----	164
4.3.1.3	Ojos-HTO -----	164
4.3.2	Análisis cuantitativo de las células GFAP+ -----	166
4.3.2.1	Número de astrocitos GFAP+ -----	166
4.3.2.2	Área de retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ -----	168
4.3.3	Intensidad de la inmunorreactividad GFAP+-----	170
4.4	Efecto de la hipertensión ocular en las células Iba-1+ de la retina. Inmunorreacción CD68+ -----	174
4.4.1	Localización y descripción morfológica de las células Iba-1+-----	174
4.4.1.1	Células Iba-1+ de la CFN-CCG-----	174

4.4.1.1.1	Grupo control de edad	174
4.4.1.1.2	Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO	176
4.4.1.2	Células Iba-1+ de la CPI	183
4.4.1.2.1	Grupo control de edad	183
4.4.1.2.2	Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO	185
4.4.1.3	Células Iba-1+ de la CNI	185
4.4.1.3.1	Grupo control de edad	185
4.4.1.3.2	Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO	188
4.4.1.4	Células Iba-1+ de la CPE	188
4.4.1.4.1	Grupo control de edad	188
4.4.1.4.2	Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO	190
4.4.1.5	Células Iba-1+ de la CFR	190
4.4.1.5.1	Grupo control de edad	190
4.4.1.5.2	Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO	191
4.4.2	Análisis cuantitativo de las células Iba-1+	194
4.4.2.1	Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+ en la CFN-CCG	194
4.4.2.2	Número de células Iba-1+ de la CPI, la CPE y de la CFR	196
4.4.2.3	Dominios espaciales de las células Iba-1+	202
4.4.3	Inmunorreacción CD68+ en las células Iba-1+	206
4.4.3.1	Grupo control de edad	206
4.4.3.2	Ojos contralaterales no tratados	206
4.4.3.3	Ojos-HTO	206
4.5	Expresión del MHC-II en las células gliales de la retina	210
4.5.1	Grupo control de edad	210
4.5.2	Ojos contralaterales no tratados	211
4.5.3	Ojos-HTO	211
5	DISCUSIÓN	219
5.1	Modelo de hipertensión ocular. Ratón albino Swiss	219
5.2	Alteración de las células ganglionares de la retina: cambios del inmunomarcaje NF-200+	221
5.3	Cambios de la población glial de la retina ante el incremento de la presión intraocular	224
5.3.1	Cambios macrogliales: astrocitos y células de Müller GFAP+	224
5.3.1.1	Intensidad de la inmunoreactividad GFAP y morfología de los astrocitos GFAP+	224
5.3.1.2	Número de astrocitos GFAP+	227
5.3.1.3	Área de retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+	228
5.3.2	Cambios en la población celular Iba-1+	229
5.3.2.1	Cambios morfológicos y dominios espaciales de las células Iba-1+	230
5.3.2.2	Redistribución de las células Iba-1+	234
5.3.2.3	Aumento del número de células Iba-1+	239
5.4	La inflamación y las células gliales en el glaucoma	242
5.5	Afectación del ojo contralateral normotenso	249

6	CONCLUSIONES	257
6	CONCLUSIONS	263
7	BIBLIOGRAFÍA	267
8	APÉNDICES	349

Resumen

Implicación de la glía retiniana en un modelo experimental de glaucoma

La **visión** es un sentido de gran valor adaptativo que ha permitido al individuo desarrollarse y evolucionar. El fenómeno de la visión, al menos inicialmente, depende de una correcta interpretación del conjunto de ondas electromagnéticas que componen los estímulos visuales, la luz. Esta percepción lumínica en los mamíferos, entre ellos los roedores, comienza a nivel de la capa más interna del ojo, **la retina**, considerada una extensión del sistema nervioso central sensible a la luz. En la retina, una serie de fenómenos químicos conocidos como fototransducción, convierten la energía lumínica incidente en señales eléctricas o impulsos nerviosos. Éstos se transmitirán de unas neuronas a otras a lo largo de la retina, abandonarán el ojo a través del nervio óptico, formado por los axones de las células ganglionares de la retina, y viajarán a través de la vía visual para alcanzar el cerebro, donde finaliza el procesamiento visual (Bear et al. 1998). La visión es una tarea de gran envergadura, tal es así que aproximadamente la mitad de la **corteza cerebral** humana se dedica al análisis del mundo visual (Bear et al. 1998).

Aunque la visión pudiera parecer ser responsabilidad exclusiva de las neuronas de la vía visual (elementos excitables), sin embargo en este proceso es necesaria la participación de otra clase de células no neuronales (elementos no excitables), las **células gliales o neuroglía**. Entre las células gliales de la retina se encuentra la población macroglial, constituida por las **células de Müller** y los **astrocitos**, y la población de **células microgliales**.

Las células gliales han sido consideradas durante mucho tiempo elementos pasivos dentro del sistema nervioso, sin embargo, su localización próxima a las neuronas y a los vasos sanguíneos es responsable de que estén **implicadas en labores vitales para la supervivencia neuronal** (Kandel et al. 2001). En condiciones normales estas células se encargan del soporte trófico y metabólico de las neuronas, del mantenimiento de la homeostasis del medio extracelular, de la formación de la barrera hematorretiniana e incluso también parecen participar en la correcta transmisión del impulso nervioso

(Pérez-Alvarez and Araque 2013). En presencia de señales de estrés tisular que pudiesen comprometer la supervivencia neuronal, las células gliales se reactivan, lo que se conoce con el nombre de **gliosis**. El objetivo básico de una gliosis aguda no es otro sino el de proteger el tejido nervioso, participando en la restauración del medio extracelular y suplementando a las neuronas con factores que promuevan su supervivencia. Sin embargo, una respuesta descontrolada, como ocurre en la mayoría de las patologías neurodegenerativas, tendrá consecuencias negativas para el tejido, asociado al incremento de sustancias neurotóxicas en el medio, como son el óxido nítrico, las especies reactivas de oxígeno o el factor de necrosis tumoral alfa (Giulian et al. 1994b). Las células gliales parecen tener un papel determinante en los procesos neurodegenerativos, estando envueltas en la etiopatogenia de enfermedades cerebrales, como el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple, y también de patologías oculares, como es el caso de la retinopatía diabética o el glaucoma.

El glaucoma, fundamento de este trabajo, es una enfermedad ocular que afecta a cerca de 60 millones de personas a nivel mundial, lo que la convierte en la **segunda causa de ceguera irreversible en el primer mundo** (Quigley and Broman 2006). Además de esta alta prevalencia, la mayoría de las formas de la patología son asintomáticas en las fases iniciales, lo que dificulta notablemente su detección antes de producirse daños severos irreparables. En general, el término glaucoma se ha empleado de manera errónea, científica y coloquialmente, para referirse a incrementos de la **presión intraocular**; sin embargo, ésta es sólo uno de los principales factores de riesgo de la patología. Otros factores de riesgo son la edad, aumentando la incidencia de la enfermedad notablemente a partir de los 60-65 años (de Voogd et al. 2005, Kanski 2004), la raza, prevaleciendo en la negra (Tielsch et al. 1991), los antecedentes familiares de glaucoma, las alteraciones vasculares y la miopía elevada (Boland and Quigley 2007) entre los más destacados. El glaucoma se define como una neuropatía óptica crónica multifactorial caracterizada por el **daño de los axones de las células ganglionares de la retina**, lo que en definitiva será consecuente con la muerte de estas neuronas. Las manifestaciones clínicas glaucomatosas más comunes son el aumento de la excavación papilar y el adelgazamiento del anillo neuroretiniano en la cabeza del nervio óptico y el adelgazamiento de la capa de fibras del nervio óptico de la retina. Todos estos

cambios se correlacionan funcionalmente con una pérdida de campo visual, que se presenta como un **fenómeno crónico y progresivo** en esta patología (Sociedad Europea de Glaucoma 2008, Weinreb and Khaw 2004). La situación sanitaria del glaucoma en la actualidad es preocupante; por un lado el control de la presión intraocular, el único factor de riesgo ante el que se puede actuar, no siempre detiene la evolución de la neurodegeneración glaucomatosa y por otro, una vez se produce el daño glaucomatoso no existe ningún tratamiento que lo revierta. Sin embargo, es interesante destacar que el 80% de los casos de ceguera causados por esta patología serían evitables si la enfermedad se detectase antes de la afectación neuronal asociada. Por todo ello, el diagnóstico precoz, el entendimiento de la etiopatogenia del glaucoma y el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras representan los principales retos terapéuticos de esta enfermedad.

Durante las primeras fases del glaucoma, aparece una serie de alteraciones que van a participar activamente en la evolución del daño glaucomatoso. Entre ellas cabe destacar la obstrucción del transporte axoplásmico, la remodelación de la matriz extracelular, la reactivación de las células gliales y la presencia de respuestas anómalas del sistema inmune.

La presencia de reacciones inflamatorias convencionales dentro del sistema nervioso podría poner en riesgo su funcionalidad. Por ello, el organismo ha desarrollado mecanismos especiales que modulan las respuestas inmunes en este tejido ante la presencia de antígenos. Esta adaptación de la respuesta en el sistema nervioso se conoce con el nombre de inmunoprivilegio. Como parte del sistema nervioso central, el ojo goza de este privilegio inmunológico, sin embargo, no es raro observar ciertas respuestas inflamatorias en el curso de determinadas patologías oculares (Hickey 1999). Por ejemplo, **la puesta en marcha de ciertas reacciones inflamatorias parece estar ligada a la patogénesis del glaucoma** (Tezel 2013).

La glía es la población de células inmunes residentes de la retina y del nervio óptico y es crucial que sean capaces de responder rápidamente, y por tanto activarse, ante cualquier tipo de daño para garantizar el privilegio inmune del que goza el tejido nervioso (Tezel et al. 2007). Inicialmente, una respuesta inmune controlada podría ser responsable de

restaurar la funcionalidad del tejido y prevenir por tanto el avance de la neurodegeneración glaucomatosa. Sin embargo, el estrés tisular sostenido en el curso de esta enfermedad está asociado a una **activación crónica de las células gliales**, un indicador claro de que están teniendo lugar procesos neuroinflamatorios (*Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009*).

El glaucoma ha sido relacionado con respuestas inflamatorias de tipo **autoinmune**, lo que exacerbaría el daño neuronal (*Tezel and Wax 2007, Tezel 2011, Tezel 2013, Wax and Tezel 2009*). Al respecto, se ha observado una mayor prevalencia de gammapatía monoclonal en los pacientes glaucomatosos; éstos presentan un incremento de autoanticuerpos en el suero y en el humor acuoso y la deposición en la retina de inmunoglobulinas y células plasmáticas (*Gramlich et al. 2013, Hammam et al. 2008, Pinazo-Duran et al. 2013, Wax et al. 1998a*). Al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes, también se ha detectado en los pacientes con glaucoma una alteración sérica de las poblaciones de linfocitos T y del receptor de la interleucina-2 (*Yang et al. 2001a*).

La reactivación glial en el glaucoma se correlaciona con un aumento de la expresión de ciertos elementos asociados al sistema inmune, entre ellos diferentes componentes del complemento (*Gramlich et al. 2013, Kuehn et al. 2006, Stasi et al. 2006, Tezel et al. 2010*), los receptores de tipo Toll (*Luo et al. 2010a*) y las **moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II)** (*Ebneter et al. 2010, Yang et al. 2001c*).

Las moléculas del MHC-II son necesarias para la presentación de los antígenos a las células T, y por tanto para su activación. El MHC-II se expresa de manera constitutiva en las células presentadoras del antígeno profesionales, es decir en las células dendríticas, los monocitos/macrófagos, los linfocitos B maduros y las células del endotelio vascular. En condiciones fisiológicas, algunas células gliales expresan niveles muy bajos de MHC-II, sin embargo ciertas citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa o el interferón gamma, son capaces de inducir un aumento en la expresión de MHC-II. Al respecto, en pacientes glaucomatosos (*Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Yang et al. 2001c*) y en modelos animales (*Ebneter et al. 2010, Tezel et al. 2007*), se ha evidenciado un incremento de la expresión de las moléculas del MHC-II en las células gliales, lo que podría estar en relación

con una respuesta inmune mediada por células T. La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento coinciden en que el glaucoma es una patología que no se caracteriza por una infiltración masiva de células T ni en la retina ni en el nervio óptico (Tezel 2013). A pesar de ello, no se puede descartar la participación de los linfocitos T en la fisiopatología del glaucoma ya que por un lado, una pequeña infiltración de estas células podría ser responsable de un daño severo del sistema nervioso central (Odoardi et al. 2007, Wekerle et al. 1987) y por otro, esta infiltración podría ser un evento transitorio que complicase su detección (Tezel et al. 2008).

La alta prevalencia de la neuropatía óptica glaucomatosa y el hecho de que en la actualidad, las técnicas diagnósticas disponibles detectan la enfermedad una vez se ha producido la pérdida irreversible de las células ganglionares de la retina, hacen necesario el desarrollo de estudios encaminados a una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos del glaucoma. El sistema inmune, y por tanto las células gliales, parecen estar jugando un papel clave en la patología glaucomatosa. A pesar de ello, no está claro si las respuestas inflamatorias mediadas en esta enfermedad son consecuentes a la muerte de las células ganglionares de la retina o por el contrario podrían ser un mecanismo que precediera y diera lugar al daño de estas células. Actualmente se conoce poco sobre los estadios más incipientes del glaucoma, anteriores a la afectación de las células ganglionares de la retina. El esclarecimiento de estos mecanismos podría ser el punto de partida para el desarrollo de nuevas **terapias de carácter neuroprotector**, lo cual mejoraría el pronóstico de esta enfermedad. Característicamente, la neuropatía óptica glaucomatosa suele ser una enfermedad bilateral, pero asimétrica en el tiempo; es decir, el daño que comienza en uno de los ojos terminará apareciendo, aunque de manera más tardía, en el ojo contralateral. Por tanto, las terapias neuroprotectoras podrían preservar el tejido nervioso no afectado en ambos ojos.

Hipótesis, justificación y objetivos

La hipertensión ocular es el principal factor de riesgo de la patología glaucomatosa, sin embargo, el control de la presión intraocular no siempre consigue detener la evolución

de la neurodegeneración asociada a esta enfermedad. Así pues, la **hipótesis de partida** de este trabajo apuesta por la existencia de otros mecanismos implicados en la fisiopatología glaucomatosa. Teniendo en cuenta la participación de la macro y microglía en el soporte neuronal y en la regulación de las respuestas inmunes, estas poblaciones celulares podrían estar envueltas de manera precoz en la puesta en marcha de los mecanismos inflamatorios asociados al glaucoma.

Los ratones se emplean rutinariamente en experimentación animal debido al bajo coste, la sencillez de su manejo (*Peters et al. 2007*), la posibilidad de ser manipulado genéticamente (*McKinnon et al. 2009, Peters et al. 2007*), y en oftalmología, debido a las similitudes que presenta la retina del ratón con la retina humana. Todo esto ha fomentado su uso en el estudio de ciertas enfermedades, entre ellas la neuropatía óptica glaucomatosa (*Howell et al. 2008, Johnson and Tomarev 2010*).

Debido a que el incremento de la presión intraocular es el principal factor de riesgo de la neuropatía óptica glaucomatosa, la hipertensión ocular se ha convertido en la base para el desarrollo de numerosos modelos en experimentación animal, entre ellos los ratones. La fotocoagulación láser de diferentes estructuras de la vía de evacuación del humor acuoso es una estrategia muy empleada para aumentar la presión intraocular. Al respecto, la fotocoagulación láser de las venas episclerales y perilimbares parece ser un método fiable y reproducible para el estudio de la patogenia asociada al glaucoma (*Cuenca et al. 2010, Gross et al. 2003, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008*). Aunque este modelo genera un incremento agudo y transitorio de la presión intraocular, sin embargo es consecuente con la muerte de las células ganglionares de la retina, el daño de sus axones y la afectación neuronal del resto de la retina (*Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a*), características propias de la neuropatía óptica glaucomatosa humana.

El **objetivo general** de este trabajo ha sido analizar cualitativa y cuantitativamente las células ganglionares de la retina NF-200+ y la respuesta de la macroglía (los astrocitos y las células de Müller) y de la microglía retiniana, en el modelo de hipertensión ocular unilateral inducida con láser en el ratón albino Swiss adulto, tanto en el ojo hipertenso (ojo-HTO) como en su ojo contralateral no tratado (normotenso).

A los 15 días de la inducción unilateral de la hipertensión ocular, y haciendo uso de técnicas de inmunofluorescencia, este estudio pretende de manera específica:

- Analizar las células ganglionares de la retina NF-200+.
- Caracterizar la respuesta de los astrocitos GFAP+ de la retina.
- Caracterizar la respuesta de las células de Müller GFAP+ de la retina.
- Determinar el comportamiento de las células Iba-1+ de la retina.
- Explorar la relación: células ganglionares de la retina NF-200+/macroglía GFAP+ y células ganglionares de la retina NF-200+/ células Iba-1+.
- Analizar el patrón de expresión en las células gliales de la retina de moléculas relacionadas con el sistema inmune, en particular las del MHC-II y el CD68.

Resultados

La **fotocoagulación láser de las venas epiesclerales y perilimbares** en los ratones Swiss albinos fue consecuente con un incremento de la presión intraocular. El comportamiento de esta hipertensión ocular siguió un patrón común en todos los animales de la muestra, convirtiéndolo en un método fiable y reproducible para el estudio de la patología glaucomatosa. Dentro de las primeras 24 horas tras el tratamiento láser, los ojos hipertensos experimentaban un incremento de la presión intraocular ($31,7 \pm 7,7$ mmHg), llegando casi a duplicar los valores basales ($16,1 \pm 2,1$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y fue entre las 24-48h cuando la presión intraocular alcanzó sus valores máximos. Posteriormente éstos descendían progresivamente hasta alcanzar a la semana del tratamiento niveles similares a los basales. El valor medio de presión intraocular en los ojos hipertensos fue de $27,9 \pm 3,9$ mmHg, los cuales diferían tanto de los registros en los animales del grupo control ($15,8 \pm 2,2$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) como en los ojos contralaterales ($15,6 \pm 1,0$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t pareada). Los valores medios de presión intraocular tanto de los animales del grupo control como de los ojos contralaterales se mantuvieron normales, no encontrándose diferencias entre ambos ojos.

Los **neurofilamentos (NFs)** son la proteína fundamental del citoesqueleto de las neuronas maduras y son muy abundantes a nivel axonal. En condiciones normales, las

isoformas fosforiladas de los NFs se localizan principalmente a lo largo de los axones (Sternberger et al. 1985). Sin embargo, ante determinadas patologías neurodegenerativas y otros daños neuronales, los NFs fosforilados de alto peso molecular (200 KDa) se localizan de forma anormal en los somas y en las dendritas proximales de las células ganglionares de la retina, lo cual es considerado un signo de daño neuronal (Balkema and Drager 1990, Buckingham et al. 2008, Dieterich et al. 2002, Drager and Hofbauer 1984, Silveira et al. 1994, Soto et al. 2008, Soto et al. 2011, Vidal-Sanz et al. 1987, Villegas-Perez et al. 1988).

Acorde a esto, en los ojos control y en los contralaterales, los NFs de 200 KDa se localizaron mayoritariamente en los axones de las células ganglionares de la retina, los cuales poseían una apariencia rectilínea. Sin embargo, tras el incremento de la presión intraocular el patrón de la inmunorreactividad NF-200+ mostraba características anómalas en los ojos hipertensos. Por un lado, los axones NF-200+ de las células ganglionares de la retina perdían su aspecto rectilíneo, observándose a lo largo de su trayecto acumulaciones varicosas NF-200+. Por otro lado, los NF-200 frecuentemente se localizaban también en los somas y las dendritas proximales de algunas células ganglionares de la retina, denotando una afectación de las mismas.

En los ratones albinos Swiss, el aumento de la presión intraocular induce alteraciones en las células ganglionares de la retina y una gliosis generalizada en la macroglía y en la microglía, no sólo en los ojos hipertensos, en los que se han descrito alteraciones neuronales, sino también en sus ojos contralaterales, en los que no existe evidencia de afectación neuronal.

Los procesos glióticos son fenómenos muy heterogéneos, sin embargo existen características universales que se repiten en todos ellos; al respecto cabe mencionar los ***cambios morfológicos***, las ***modificaciones inmunofenotípicas***, la ***proliferación celular***, la ***producción de sustancias pro- y antiinflamatorias*** o de ***factores de crecimiento*** (Kettenmann and Verkhratsky 2008) y el ***incremento o la expresión de novo de ciertas moléculas***.

Tras el incremento de la presión intraocular en los ratones albino Swiss, la inmunotinción con anticuerpos frente a la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) reveló una **reactivación de la población de las células macrogliales**.

La **GFAP** es la constituyente fundamental del citoesqueleto de los astrocitos maduros. Las células de Müller de la retina en condiciones normales expresan generalmente niveles muy bajos de GFAP (*Bignami 1984, Jones and Schechter 1987, Linser et al. 1985, Semple-Rowland 1991, Torelli et al. 1989, Xue et al. 2006*). Sin embargo ante situaciones de estrés, como es el caso del glaucoma (*Ramírez et al. 2010, Xue et al. 2006*), las células de Müller modifican la composición de su citoesqueleto, incrementando la proporción de GFA, signo claro de reactivación glial.

En este estudio, el inmunomarcaje GFAP+ en condiciones normales se localizaba principalmente en unas células de aspecto estrellado, coincidentes con la morfología de los astrocitos. De manera esporádica, en los animales del grupo control se podían observar unas estructuras puntiformes GFAP+ dispersas por la superficie retiniana que se correspondían con los pies terminales de las células de Müller. Tras el incremento de la presión intraocular, en los ojos hipertensos se observó por toda la retina un **aumento sustancial de la GFAP** en los pies terminales de las células de Müller. En estos ojos, coexistían unos astrocitos GFAP+ morfológicamente similares a los del grupo control, y otros en los que tan sólo se podían apreciar sus prolongaciones celulares primarias pero no las de orden superior. Curiosamente, los astrocitos de los ojos contralaterales también experimentaban cambios sugerentes de activación glial. Éstos eran más robustos y el área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ aumentaba respecto a los valores de los ojos control ($P < 0,05$, prueba-t no pareada). De manera esporádica, y coincidiendo con lo observado en el grupo control, en los ojos contralaterales se distinguían unas estructuras punteadas GFAP+ que correspondían con los pies terminales de las células de Müller.

En ambos ojos de los animales fotocoagulados, se observaban zonas donde la intensidad de la inmunorreactividad GFAP era aparentemente mayor a la encontrada en los ojos control. Los resultados mostraron un incremento de la intensidad de la

inmunorreactividad GFAP tanto en los ojos contralaterales ($P < 0,05$, prueba-t no pareada) como en los ojos hipertensos ($P < 0,01$, prueba-t no pareada).

Esta astrogliosis GFAP+ era de tipo **no proliferativa**, no observándose por tanto un incremento del número celular en ninguno de los dos ojos de los animales fotocoagulados. Es más, en los ojos hipertensos el número de astrocitos de características similares a los observados en el grupo control era notablemente menor ($P < 0,01$, prueba-t no pareada) y como consecuencia, el área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ mostraba una reducción significativa respecto a los resultados de los ojos contralaterales ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y a los ojos control ($P < 0,01$, prueba-t no pareada).

La degeneración de las células ganglionares de la retina en este modelo de hipertensión ocular unilateral también se acompañó por la reactivación de la población de **células Iba-1+**.

Tanto en el cerebro como en la retina, el anticuerpo **Iba-1** (*ionized calcium-binding adapter molecule*), también conocido como AIF-1 (*allograft inflammatory factor-1*), localiza una proteína de membrana en las células del linaje de los monocitos/macrófagos, por tanto en las células dendríticas, los macrófagos y la microglía, pero no en las neuronas, los astrocitos ni en la oligodendroglía (Fu et al. 2011, Imai et al. 1996, Ito et al. 1998, Kaneko et al. 2008, Liu et al. 2007, Naskar et al. 2002, Ohsawa et al. 2000, Schallner et al. 2012).

En condiciones normales, las células Iba-1+ de los ratones albinos Swiss se distribuían en diferentes capas retinianas. Característicamente estaban ausentes de la capa nuclear externa, pero podían observarse en la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares, en las capas plexiformes interna y externa, en la capa de fotorreceptores y puntualmente a nivel de la capa nuclear interna. Por norma, las células Iba-1+ de cada estrato se disponían paralelas a la superficie retiniana sin invadir las capas anexas. La mayoría de las células Iba-1+ tenía un soma pequeño del que emergían numerosas prolongaciones ramificadas profusamente; no obstante, en determinados estratos coexistían con éstas otras morfologías celulares. Así, en la capa de fibras del nervio óptico, se observaban unas células Iba-1+ gruesas y alargadas que se disponían sobre la

pared de los vasos. En la capa plexiforme interna, aparecía una pequeña población de células Iba-1+ de aspecto dendritiforme en la región yuxtapapilar y en una zona del parénquima retiniano próximo a la ora serrata. Toda la población de células Iba-1+ de la capa de fotorreceptores era morfológicamente diferente al resto de capas; en ella se observaban unas células Iba-1+ alargadas poco ramificadas y otras células Iba-1+ con somas ovoideos que se caracterizaban por tener múltiples prolongaciones que emergían desde un mismo punto del soma como las raíces de un árbol. En general, las células Iba-1+ en los diferentes estratos retinianos se distribuían conformando un mosaico celular, en el que no existían contactos entre las células vecinas; sin embargo, en la capa de fotorreceptores las células estaban dispersas de una manera poco homogénea por toda extensión retiniana sin formar esta estructura a modo de mosaico.

En comparación con las observaciones de las muestras control, **las células Iba-1+** de los ojos hipertensos mostraban cambios sugerentes de reactivación; estos cambios también se observaban en los ojos contralaterales, aunque de manera menos marcada. Entre ellos, las células Iba-1+ **se desplazaban** a las capas vecinas; experimentaban una **retracción generalizada de sus prolongaciones y aparecían** células Iba-1+ de apariencia ameboidea en la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares y en la capa de fotorreceptores. El análisis cuantitativo reveló: i) un **aumento del número** global (capa plexiforme interna, capa plexiforme externa y capa de fotorreceptores) de células Iba-1+ de la retina ($P < 0,001$ en los ojos hipertensos y $P < 0,05$ en los ojos contralaterales; prueba-t no pareada); ii) un incremento del área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+ en la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares ($P < 0,001$ ojos hipertensos y $P < 0,01$ contralaterales, prueba-t no pareada); y iii) una **reducción del dominio espacial** de estas células Iba-1+ en la capa plexiforme interna ($P < 0,001$ ojos hipertensos y contralaterales, prueba-t no pareada) y en la capa plexiforme externa ($P < 0,001$ ojos hipertensos y $P < 0,05$ contralaterales, prueba-t no pareada).

Además de esto, de forma exclusiva en algunos estratos retinianos en los ojos hipertensos se observaba la presencia de nuevos tipos morfológicos celulares Iba-1+. Así, en la capa de fibras del nervio óptico se observaron unas células alargadas semejantes a la

microglía en bastón descrita en procesos neurodegenerativos en el cerebro. Estas **células Iba-1+ en bastón** de la retina tenían un soma alargado y dos prolongaciones que emergían de sus polos y se relacionaban estrechamente con las prolongaciones de las células Iba-1+ en bastón vecinas. Esta relación entre ellas daba lugar en la retina a la formación de unas estructuras a modo de trenes celulares que discurrían paralelos al curso de los axones NF-200+ de las células ganglionares de la retina. Algunas de las prolongaciones Iba-1+ contactaban con los somas y las dendritas de las células ganglionares de la retina NF-200+. Próximas a los vasos de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares se observaban unas **células mononucleadas de aspecto redondeado Iba-1+**. En la capa de fotorreceptores, además de estas células redondeadas aparecían también unas células Iba-1+ de aspecto **dendritiforme**.

Cuando el tejido nervioso sufre un daño asociado a la degeneración y/o la muerte neuronal, la microglía puede alcanzar un **estadio reactivo fagocítico** (Minagar et al. 2002, Nakajima and Kohsaka 2005, Thanos and Richter 1993, Thanos et al. 1992, Thanos 1993), capaz de reconocer y eliminar las neuronas deterioradas (Thanos 1992, Thanos and Richter 1993, Thanos 1991, Thanos et al. 1992). El anticuerpo ED-1 se une al antígeno **CD68**, conocido también como macrosialin en el ratón, una glicoproteína de membrana de los lisosomas y de la membrana plasmática de las células con capacidad fagocítica activa (da Silva and Gordon 1999, Kullberg et al. 2001, Kurushima et al. 2000, Milligan et al. 1991), entre ellas la microglía. De manera muy incipiente tras el daño, la expresión de ED-1 aumenta considerablemente, y vuelve a valores normales cuando la muerte neuronal culmina (Santos et al. 2010).

En este estudio, las células Iba-1+ presentaban un inmunomarcaje CD68+, siendo éste variable en función del estrato retiniano. En los ojos control, las células Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares, capa plexiforme interna, capa nuclear interna y capa plexiforme externa presentaban esporádicamente un inmunomarcaje puntiforme CD68+. Sin embargo, la mayoría de las células Iba-1+ con somas ovoideos de la capa de fotorreceptores presentaban amplias regiones celulares CD68+, un patrón que se observaba tan sólo en algunas de las células Iba-1+ con somas alargados de esta capa. En los ojos contralaterales el patrón del inmunomarcaje CD68+ era,

en general, similar al del grupo control, sin embargo las células de aspecto ameboideo Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares y de la capa de fotorreceptores se caracterizaban por presentar amplias regiones celulares CD68+. En los **ojos hipertensos**, la mayoría de las células Iba-1+ de la retina tenían un inmunomarcaje CD68+, sin embargo eran las células de aspecto ameboideo, las células redondeadas y las células Iba-1+ en bastón las que presentaban un ***inmunomarcaje CD68+ más intenso***.

Además del CD68, la población macro y microglial puede expresar otras moléculas relacionadas con el sistema inmune, entre ellas ***el MHC-II***. Como ya se ha mencionado, el MHC-II es necesario para la presentación antigénica a los linfocitos T. En condiciones normales la expresión de estas moléculas en el sistema nervioso es muy baja, siendo la microglía la principal célula que expresa este tipo de antígenos (Gehrmann et al. 1995, Graeber and Streit 2010, Hayes et al. 1987, Streit et al. 1989), y no observándose ni en los astrocitos ni en las células de Müller (Aloisi 2001, Zhang et al. 1997). Sin embargo, bajo prácticamente todas las condiciones inflamatorias y neurodegenerativas, la expresión del MHC-II aumenta de forma considerable en la glía reactiva, tanto en la microglía (Graeber and Streit 2010, Kreutzberg 1996, Streit and Sparks 1997) como en los astrocitos (Xiao and Link 1998) y en las células de Müller (Tezel et al. 2007).

Las células Iba-1+ y los astrocitos GFAP+ de la retina de los ratones Swiss del grupo control mostraban una débil expresión constitutiva de las moléculas del MHC-II. Sin embargo, ésta era intensa en las células de aspecto dendritiforme Iba-1+ de la capa plexiforme interna y en algunas células perivasculares Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares. En los ojos contralaterales ***tras el incremento de la presión intraocular, las células Iba-1+, los astrocitos GFAP+ y las células de Müller GFAP+ experimentaron un incremento generalizado del inmunomarcaje MHC-II+***. En los ojos hipertensos el aumento en la expresión del MHC-II en todos los tipos morfológicos celulares Iba-1+ fue similar a la observada en los ojos contralaterales; sin embargo la expresión de MHC-II fue diferente entre la población macroglial: estaba aumentada en las células de Müller por toda la retina pero no en los astrocitos.

En base a estos resultados **concluimos** que:

1. En los ratones albinos Swiss la fotocoagulación láser de las estructuras limbares es un método fiable y reproducible para inducir hipertensión ocular. Este modelo genera incrementos de presión intraocular que, a pesar de su carácter agudo, produce efectos similares a los cambios crónicos asociados a la neuropatía óptica glaucomatosa humana.

2. A los 15 días del tratamiento láser, en los ojos con hipertensión ocular se produce una afectación de las células ganglionares de la retina, evidenciada por la presencia de somas y dendritas de estas células con un inmunomarcaje NF-200+.

3. A los 15 días del tratamiento láser, tanto en los ojos con hipertensión ocular como en los ojos contralaterales no tratados, se produce una gliosis generalizada de la población macro y microglial de la retina.

4. En los ojos con hipertensión ocular se observa una gliosis astrocitaria no proliferativa caracterizada por cambios morfológicos celulares y por un incremento global de la GFAP. Las células de Müller también aumentan la expresión de la GFAP como signo de reactivación.

5. En los ojos con hipertensión ocular se observa una gliosis proliferativa de las células Iba-1+ caracterizada por la retracción de las prolongaciones celulares, lo que se correlaciona con la reducción del dominio espacial de estas células en la retina.

6. En los ojos contralaterales normotensos no tratados se produce una gliosis generalizada semejante a la de los ojos con hipertensión ocular, a pesar de no existir evidencias de afectación neuronal.

7. Las células Iba-1+ en bastón de la capa de fibras del nervio óptico-capo de células ganglionares y las células redondeadas Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico-capo de células ganglionares y de la capa de fotorreceptores, se restringen exclusivamente a los ojos con hipertensión ocular.

8. Las células Iba-1+ de los ojos con hipertensión ocular experimentan un incremento global de la expresión del CD68. Preferentemente la mayor expresión de CD68 se localiza en las células en bastón de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares y en las células de apariencia redondeada de la capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares y de la capa de fotorreceptores.

9. Tanto en los ojos con hipertensión ocular como en los ojos contralaterales normotensos no tratados se observa un aumento similar y generalizado de la expresión de las moléculas del MHC-II en la población Iba-1+. En la macroglía GFAP+ de los ojos contralaterales no tratados esta expresión se localiza preferentemente en los astrocitos, quedando restringida a las células de Müller en los ojos con hipertensión ocular.

10. En los ojos contralaterales no tratados normotenso, sin signos neurodegenerativos, la expresión del MHC-II en las células Iba-1+ y en los astrocitos GFAP+ podría estar en relación con una respuesta inmune que trate de restaurar la homeostasis del tejido. Por el contrario, en los ojos con hipertensión ocular con presencia de afectación neuronal, el incremento de la expresión del MHC-II en las células Iba-1+ y las células de Müller GFAP+, podría estar asociado a una reactivación glial exacerbada asociada a procesos neuroinflamatorios de tipo neurotóxico.

11. El aumento de la expresión del MHC-II y del CD68 en la glía de la retina y la presencia de células redondeadas mononucleadas Iba-1+/MHC-II+/CD68+ en el parénquima retiniano, que podrían estar infiltradas desde el torrente sanguíneo, parece apoyar la implicación del sistema inmune en la fisiopatología glaucomatosa en este modelo de hipertensión ocular, no sólo en los ojos con hipertensión ocular sino también en los ojos contralaterales no tratados.

12. En el modelo de hipertensión ocular unilateral inducida por láser utilizado en este estudio, el ojo contralateral no debe ser empleado como control

Summary

Implication of retinal glial cells in an experimental model of glaucoma

Vision constitutes an extraordinary valuable sensory perception crucial for the development of individuals and their capacity to adapt to their environment. The phenomenon of vision, at least at its very basis, depends on the correct interpretation of electromagnetic waves which form the visual stimuli -- the light. The process of perception of light in mammals, including rodents, begins at the level of the innermost layer of the eye, **the retina**, which is considered to be a light-sensitive extension of the central nervous system. In the retina, a series of chemical phenomena known as phototransduction transforms incident photonic energy into electric signals or nerve impulses. The latter propagate from one neuron in the retina to another, ultimately leaving the eye via the optic nerve, which is formed by the axons of the retinal ganglion cells. Subsequently, the impulses travel through the visual pathway until eventually reaching the brain where the visual processing is completed (Bear et al. 1998). Vision is a task of immense importance, being reflected by the fact that approximately half of the **cerebral cortex** in humans is involved in the analysis of the visual world (Bear et al. 1998).

At first sight it might seem that neurons alone as the excitable elements are exclusively responsible for the vision. However, in this process the participation of another class of non-neural (non-excitabile) cells, so-called **glial cells or neuroglia**, is absolutely indispensable. The retinal glial cells are sub-divided into macroglial cells on the one hand, including the Müller cells as well as the astrocytes, and the microglial cells on the other hand.

Glial cells have been considered for a long time as purely passive elements within the nervous system. Yet, their close proximity to the neurons and blood vessels causes them to be **involved in vital tasks that are essential for the survival of neurons** (Kandel et al. 2001). Under normal conditions, glial cells provide trophic and metabolic support to neurons and are responsible for maintaining the homeostatic environment required for appropriate neuronal functioning. Furthermore, they are involved in the formation of the blood-brain

retinal barrier, and might even play a role in the correct transmission of nerve impulses (Pérez-Alvarez and Araque 2013). Under conditions of stress on the tissue that might put at risk neuronal survival, glial cells are reactivated, a process known as **gliosis**. The aim of an acute gliosis is the protection of the nervous tissue by reestablishing the extracellular medium and by supplementing neurons with factors that promote their survival. Nonetheless, an uncontrolled response, as it occurs in the majority of the neurodegenerative diseases, will have a negative impact on the tissue, associated with an increase in neurotoxic substances, such as nitric oxide, reactive oxygen species and the tumor necrosis factor alpha (Giulian et al. 1994b). Glial cells seem to play a crucial role in the neurodegenerative processes, being involved in the etiopathogenesis and the course of brain pathologies such as Alzheimer, Parkinson and multiple sclerosis, as well as in diseases of the retina like diabetic retinopathy and glaucoma.

Glaucoma, on which we focus in the present work, is a disease of the eye affecting about 60 million people worldwide, and thus constitutes **the second most frequent cause of irreversible blindness in first-world countries** (Quigley and Broman 2006). In addition to this high level of prevalence, most forms of the pathology are asymptomatic at the initial stages of the disease, which in turn substantially obstructs its detection before it causes irreversible and severe damages. The term “glaucoma” has been used in an erroneous manner, both within the scientific community as well as in habitual language use, generally referring to increases of the intraocular pressure. However, the latter only constitutes the major risk factor of the disease. Other risk factors are the age, associated with a notable increase in the probability of occurrence of the pathology beyond the age of 60-65 years (de Voogd et al. 2005, Kanski 2004), race, prevailing among the black (Tielsch et al. 1991), ancestors suffering glaucoma, vascular alterations and elevated level of myopia (Boland and Quigley 2007). Glaucoma is defined as a chronic, multifactorial optic neuropathy, characterized by the **damage of the axons of the retinal ganglion cells**, which ultimately results in the death of these neurons. The most common clinical manifestations of glaucoma are the increase of the optic disc excavation and the thinning of the neuroretinal rim at the optic nerve head and the reduction of the optic nerve fiber layer of the retina. All these changes are functionally correlated with a loss of the visual field, which becomes manifest as a **chronical**

and progressive phenomenon for this disease (*Sociedad Europea de Glaucoma 2008, Weinreb and Khaw 2004*). The medical situation of glaucoma is alarming: on the one hand, the control of the intraocular pressure as the only risk factor that allows one to take actions, does not always stop the progression of the glaucomatous neurodegeneration. On the other hand, once damages due to glaucoma take place, no treatments to reverse them exist. However, it is worth mentioning that 80% of the cases of blindness caused by this pathology would be evitable if the disease was detected before the associated neuronal effects set in. Thus, due to all these reasons, an early diagnosis, the understanding of the etiopathogenesis of the glaucoma and the development of novel neuroprotective therapies represent the major challenges for medical treatment of this disease.

During the initial phases of the glaucoma, a series of alterations appear which actively participate in the evolution of the damage caused by the glaucoma. Among these alterations, there stand out the obstruction of the axoplasmic transport, the remodeling of the extra-cellular matrix, the reactivation of the glial cells and the presence of anomalous responses of the immune system.

Conventional inflammatory responses within the nervous system could put at risk its functioning; due to this reason there exist special mechanisms which modulate the responses that are produced in the presence of antigens in the nervous tissue. This is known as immune privilege. The eye is considered to be a place possessing an immune privilege, however, not exceptionally, one observes inflammatory responses in the course of certain ocular pathologies (*Hickey 1999*). For instance, ***the initiation of certain inflammatory reactions appears to be related to the pathogenesis of glaucoma*** (Tezel 2013).

Glial cells are the population of immune cells that reside in the retina and the optic nerve, and it is of crucial importance that these cells are able to respond and get activated rapidly under the presence of any type of damage, in order to guarantee the immune privilege the nervous tissue enjoys (Tezel et al. 2007). In the first place, a controlled immune response could be responsible for the restoration of the functionality of the tissue, and thus for preventing an advance of the neurodegeneration due to glaucoma. However, a sustained stress of the

tissue in the course of this disease is associated with a **chronic activation of the glial cells**, which is a clear indicator of neuro-inflammatory processes taking place (Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009).

Glaucoma has been related to inflammatory responses of **autoimmune** character, which in turn exacerbating the neuronal damage (Tezel and Wax 2007, Tezel 2011, Tezel 2013, Wax and Tezel 2009). In this context, an increased prevalence of monoclonal gammopathy has been observed in glaucoma patients; these present an increase in the level of antibodies in the serum and in the aqueous humor and the deposition of immunoglobulins and plasma cells in the retina (Gramlich et al. 2013, Hammam et al. 2008, Pinazo-Duran et al. 2013, Wax et al. 1998a). Similar to other autoimmune disorders, a serum alteration of the populations of T lymphocytes and of interleukin-2 receptors has been detected (Yang et al. 2001a).

Glial reactivation in glaucoma is correlated with an increase of the expression of certain elements associated to the immune system, including various components of the complement (Gramlich et al. 2013, Kuehn et al. 2006, Stasi et al. 2006, Tezel et al. 2010), toll-like receptors (Luo et al. 2010a), and **major histocompatibility complex class-II molecules (MHC-II)** (Ebnetter et al. 2010, Yang et al. 2001c).

MHC-II molecules are necessary for antigen presentation to the T cells, and thus for their activation. The MHC-II is constitutively expressed in professional antigen presenting cells, i.e. in the dendritic cells, the monocytes/macrophages, the mature B lymphocytes, and the cells of the vascular endothelium. Under physiological conditions, some glial cells express very low levels of MHC-II, however, an upregulation of MHC-II can be induced in the presence of certain proinflammatory cytokines, such as the tumor necrosis factor alpha or the interferon gamma. In this context, both for glaucoma patients (Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Yang et al. 2001c) and in animal models (Ebnetter et al. 2010, Tezel et al. 2007), there has been reported evidence for an increase in the expression of MHC-II molecules in glial cells, which could be related to an immune response mediated by T cells. The majority of the studies realized to date agree on that the glaucoma is a pathology which is not characterized by a massive infiltration of T cells neither in the retina nor in the optic nerve (Tezel 2013). Nevertheless, one cannot exclude the participation of T lymphocytes in the

physiopathology of the glaucoma, the more so as on the one hand a only small infiltration of these cells could be responsible for causing a severe damage of the central nervous system (*Odoardi et al. 2007, Wekerle et al. 1987*), and since on the other hand such infiltration could still be a transitory event which might complicate its detection (*Tezel et al. 2008*).

The high prevalence of the glaucomatous optic neuropathy, in combination with the fact that currently available diagnostic techniques only detect the disease once irreversible loss of retinal ganglion cells has taken place, call for the development of studies that aim at an improved understanding of the pathogenic mechanisms of the glaucoma. The immune system and thus the glial cells seem to play a key role in the physio-pathology of glaucoma. Nonetheless, it is still unclear whether the inflammatory responses associated with this disease are a consequence of the death of the retinal ganglion cells, or whether, on the contrary, they might be a mechanism which precedes and causes the damage of these cells. Today, only little is known about the most incipient phases of the glaucoma which precede the involvement of the retinal ganglion cells. The clarification of these mechanisms can be the starting point for the development of novel **neuroprotective therapies**, what in turn would substantially improve the prognosis of this disease. Characteristically, the glaucomatous optic neuropathy usually is a bilateral disease, though asymmetric in time: this means that the damage initially present in one of the eyes, eventually also appears with a time delay in the contralateral eye. Thus, neuroprotective therapies could help to preserve the non-affected nervous tissue in both eyes.

Hypothesis, Justification and Objectives

Ocular hypertension is the main risk factor of glaucoma, however, it is not always possible to stop the evolution of the neurodegeneration associated with this disease by means of the control of the intraocular pressure. Hence, the **starting hypothesis** of the present work is the existence of other mechanisms implicated in the physiopathology of glaucoma. Taking into account the implication of macro and microglia in the neuronal support and the regulation of immune responses, these cellular populations might be

participating at an early stage in the activation of inflammatory mechanisms associated with glaucoma.

Mice are used on a regular basis in animal experimentation, owing to their low cost, simple operating handle (*Peters et al. 2007*), the possibility to be genetically manipulated (*McKinnon et al. 2009, Peters et al. 2007*), and in ophthalmology, due to the similarities that exhibits the retina of mice with human retina. These factors have promoted their use in the study of certain ocular diseases, including the optic neuropathy of glaucoma (*Howell et al. 2008, Johnson and Tomarev 2010*).

Based on the fact that an increase of the intraocular pressure constitutes the main risk factor of the glaucomatous optic neuropathy, ocular hypertension has become the basis for the development of numerous experimental animal models, including mice. Laser photocoagulation of different structures in the aqueous humour outflow pathway is a widely employed strategy to increase the intraocular pressure. Here, laser photocoagulation of the episcleral and perilimbal veins seems to be a reliable and reproducible method for studying the pathogenesis associated with glaucoma (*Cuenca et al. 2010, Gross et al. 2003, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008*). Although this model generates an acute and transitory increase of the intraocular pressure, it induces the death of the retinal ganglion cells, the damage of their axons and neuronal changes in other parts of the retina (*Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a*), which are inherent properties of the glaucomatous optic neuropathy in humans.

The **overall objective** of this work has been the qualitative and quantitative analysis of the NF-200+ retinal ganglion cells and of the response of the macroglia (the astrocytes and the Müller cells) and the microglia of the retina, in the experimental model of unilateral laser-induced ocular hypertension in adult albino Swiss mice, in the hypertensive eye as well as in the untreated contralateral eye (normotensive).

Fifteen days after the unilateral induction of the ocular hypertension, and making use of immunofluorescence techniques, this study specifically aims at:

- An analysis of the NF-200+ retinal ganglion cells.
- A characterization of the response of GFAP+ astrocytes of the retina.
- The characterization of the response of GFAP+ Müller cells of the retina.
- The determination of the behavior of Iba-1+ cells of the retina.
- An exploration of the relationship between NF-200+ retinal ganglion cells/GFAP+ macroglia and NF-200+ retinal ganglion cells/Iba-1+-retinal cells.
- An analysis of the expression pattern in the glial cells of the retina of molecules related with the immune system, specifically MHC-II and CD68.

Results

Laser photocoagulation of the episcleral and perilimbar veins in albino Swiss mice produced an increase of the intraocular pressure. The profile of this ocular hypertension model followed a common pattern for all animals of the sample, rendering it into a reliable and reproducible method for the study of glaucomatous pathology. Hypertensive eyes experienced an increase of the intraocular pressure ($31,7 \pm 7,7$ mmHg) within the first 24 hours after laser treatment, reaching values as high as almost twice the baseline values (16.1 ± 2.1 mmHg, $P < 0.001$, paired t-test). It was between 24 and 48 hours after laser treatment when the intraocular pressure reached its maximum values. Afterwards these values decreased gradually until recovering, one week after the treatment, values similar to the initial baseline levels. The mean intraocular pressure in hypertensive eyes was 27.9 ± 3.9 mmHg, which differed significantly from both the records of the animals in the naive group ($15,8 \pm 2,2$ mmHg, $P < 0.001$, unpaired t-test) and the values in contralateral eyes (15.6 ± 1.0 mmHg, $P < 0.001$, paired t-test). All observed values in naive and contralateral eyes were lying within the normal limits, and no differences between both eyes were found.

Neurofilaments (NFs) are the major cytoskeletal protein of mature neurons, and they are very abundant at the axonal level. The phosphorylated isoforms of the NFs are

located mainly along axons (Sternberger et al. 1985) under normal conditions. However, in certain neurodegenerative diseases and other neuronal damages, the phosphorylated high molecular weight NFs (200 kDa) are located abnormally on the somas and on proximal dendrites of retinal ganglion cells which is considered a sign of neuronal damage (Balkema and Drager 1990, Buckingham et al. 2008, Dieterich et al. 2002, Drager and Hofbauer 1984, Silveira et al. 1994, Soto et al. 2008, Soto et al. 2011, Vidal-Sanz et al. 1987, Villegas-Perez et al. 1988).

In agreement with this, in naive and contralateral eyes in our study 200 KDa NFs were mainly located at the axons of the retinal ganglion cells, with the axons displaying a rectilinear morphology. However, after the increase of the intraocular pressure, the NF-200+ immunostaining pattern in the hypertensive eyes showed abnormal characteristics. Firstly, the NF-200+ retinal ganglion cells axons lost their rectilinear appearance showing along their path varicose NF-200+ accumulations. Secondly, NF-200 were also frequently localized in the soma and primary dendrites of some retinal ganglion cells, indicating an impairment of the latter.

The increase of the intraocular pressure in Albino Swiss mice induced alterations of the retinal ganglion cells as well as a widespread macro and microgliosis not only for hypertensive eyes, in which neuronal damage has been reported, but also in the corresponding contralateral eyes, for the latter in the absence of evident neuronal damage.

Whereas gliotic processes are very heterogeneous phenomena, nonetheless there exist universal features that recur in all of them. The most important ones are: ***morphological changes, immunophenotypical changes, cell proliferation, increase or novo expression of certain molecules***, and the ***production of pro- or anti-inflammatory molecules*** and ***growth factors*** (Kettenmann and Verkhratsky 2008).

Following the increase of the intraocular pressure in Albino Swiss mice immunostaining of the retina with an antibody against the glial fibrillary acidic protein (GFAP) revealed a ***macroglial cell activation***.

GFAP constitutes the major cytoskeletal protein of mature astrocytes. Under normal conditions, retinal Müller cells generally display very low levels of GFAP (*Bignami 1984, Jones and Schechter 1987, Linser et al. 1985, Semple-Rowland 1991, Torelli et al. 1989, Xue et al. 2006*). However, under stress situations, such as glaucoma (*Ramírez et al. 2010, Xue et al. 2006*), Müller cells change the composition of their cytoskeleton increasing the GFAP proportion, which is a clear sign of glial activation.

In this study, the GFAP immunostaining were under normal conditions mainly located in star-shaped cells, consistent with the morphology of the astrocytes. Punctate GFAP+ structures scattered over the retinal surface, corresponding to the endfeet of Müller cells, could be sporadically observed in naïve retinas. Following the increase of intraocular pressure, a **substantial increase of GFAP** at the endfeet of the Müller cells was found throughout the retina of the hypertensive eyes. In these eyes, there was found a coexistence of GFAP+ astrocytes morphologically similar to astrocytes of naïve eyes, and of others, in which only primary processes, but no higher level processes, could be observed. Interestingly, astrocytes in the contralateral eyes also underwent changes suggestive of glial activation. They were more robust and the GFAP-labeled retinal area was increased in comparison with naïve eyes ($P < 0.05$, unpaired t-test). Sporadically, some punctate GFAP+ structures coincident with the endfeet of the Müller cells were observed in contralateral retinas, yielding a similar picture to the one found in the naïve group.

In both eyes of the photocoagulated animals, areas where the intensity of GFAP immunoreaction was greater than in the naïve eyes were observed. Results showed an increase of the intensity of GFAP immunoreaction both in contralateral eyes ($P < 0.05$, unpaired t-test) as in the hypertensive eyes ($P < 0.01$, unpaired t-test).

This GFAP+ astrogliosis was observed as a **nonproliferative** response. The number of astrocytes did therefore not increase in any of the two eyes analyzed in the photocoagulated animals. Moreover, in the hypertensive eyes, the number of astrocytes with similar characteristics to those observed in naïve eyes was significantly lower ($P < 0.01$, unpaired t-test) and as a consequence the GFAP-labeled retinal area showed a significant

reduction as compared to the results from the contralateral eyes ($P < 0.001$, paired t-test) and naive eyes ($P < 0.01$, unpaired t-test).

The degeneration of retinal ganglion cells in this unilateral model of ocular hypertension was also accompanied by a reactivation of the population of ***Iba-1+* cells**.

Both in the brain and in the retina, the ***Iba-1*** antibody (*ionized calcium binding adapter molecule*), also known as AIF-1 (*allograft inflammatory factor-1*), binds to a protein in the membrane of the monocyte/macrophages lineage cells. Therefore, it locates dendritic cells, macrophages and microglia, but not neurons, astrocytes and oligodendroglia (*Fu et al. 2011, Imai et al. 1996, Ito et al. 1998, Kaneko et al. 2008, Liu et al. 2007, Naskar et al. 2002, Ohsawa et al. 2000, Schallner et al. 2012*).

Under normal conditions, *Iba-1+* cells in naive albino Swiss mice were distributed in different retinal layers. Characteristically, they were absent from the outer nuclear layer, but could be observed in the nerve fiber layer-ganglion cell layer, in the inner and outer plexiform layers, in the photoreceptor layer and sometimes at the inner nuclear layer. In most cases, *Iba-1+* cells were arranged in each layer parallel to the retinal surface without invading the adjoining stratum. Most *Iba-1+* cells had a small soma from which emerged numerous and profusely branched processes. However, in certain layers, they coexisted with other cell morphologies. Thus, in the nerve fiber layer, *Iba-1+* thick elongated cells arranged on the vessel wall were observed. In the inner plexiform layer, a small population of *Iba-1+* cells with dendritiform morphology was observed in the juxtapapillary region and near the ora serrata. The entire population of *Iba-1+* cells in the photoreceptor layer was morphologically different from other layers. In it two main morphological types of *Iba-1+* cells were observed: an elongated lightly branched and other with ovoid somas having numerous processes emerging from the same point of the soma as the roots of a tree. *Iba-1+* cells were distributed throughout the retina in a mosaic-like fashion without overlapping between neighboring cells. However, in the photoreceptor layer cells were dispersed in a heterogeneous manner throughout the retinal extension without forming this structure in a mosaic-like fashion.

In comparison with observations in naive eyes, Iba-1+ cells in hypertensive eyes exhibited changes suggestive of activation. These changes were also observed in the contralateral eyes, though in a less pronounced manner. Among them, ***Iba-1+ cells migrated to adjacent layers*** underwent widespread ***retraction of their processes***, and amoeboid Iba-1+ cells appeared in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer. The quantitative analysis revealed: i) an ***increase of the number of Iba-1+ cells*** in the retina (sum of inner plexiform layer, outer plexiform layer and photoreceptor layer) ($P < 0.001$ for hypertensive eyes and $P < 0.05$ for contralateral; unpaired t-test); ii) an increase in the area of the retina occupied by Iba-1+ immunostaining in the nerve fiber layer-ganglion cell layer ($P < 0.001$ hypertensive eyes and $P < 0.01$ contralateral, unpaired t-test); and iii) a ***reduction of the spatial domain*** covered by each Iba-1+ cells in the inner plexiform layer ($P < 0.001$ for hypertensive eyes and contralateral eyes, unpaired t-test) and outer plexiform layer ($P < 0.001$ for hypertensive eyes and $P < 0.05$ for contralateral eyes, unpaired t-test).

Besides this, only in some retinal layers of the hypertensive eyes new morphological types of Iba-1+ cells were observed. Thus, in the nerve fiber layer elongated cells similar to rod microglia described in neurodegenerative processes in the brain were observed. ***Rod-like Iba-1+ cells*** in the retina had elongated cell bodies and two processes prominently projected from each pole, which were closely related to the neighboring rod-like Iba-1+ cell processes. This relationship between them gave rise to the formation of cellular trains-like structures in the retina that run parallel to the NF-200+ retinal ganglion cells axons. Some of Iba-1+ processes contacted the somas and dendrites of NF-200+retinal ganglion cells. Next to the vessels of the the nerve fiber layer-ganglion cell layer ***mononuclear rounded Iba-1+ cells*** were found. In the photoreceptor layer, in addition to these rounded cells, Iba-1+ cells with ***dendritiform morphology*** were also observed.

When the nervous tissue suffers a damage associated with degeneration and/or neuronal death, microglía can reach a ***reactive fagocitic state*** (Minagar et al. 2002, Nakajima and Kohsaka 2005, Thanos and Richter 1993, Thanos et al. 1992, Thanos 1993), capable of detecting and removing damaged neurons (Thanos 1992, Thanos and Richter 1993, Thanos 1991, Thanos et al. 1992).

ED-1 antibody binds to the **CD68 antigen**, also known as macrosialin in mice, a glycoprotein in the membrane of lysosomes and of the plasma membrane of active phagocytic cells (*da Silva and Gordon 1999, Kullberg et al. 2001, Kurushima et al. 2000, Milligan et al. 1991*), including microglia. At a very early stage after the damage, ED-1 expression increases considerably, and returns to basal values when the neuronal death culminates (*Santos et al. 2010*).

In this study, Iba-1+ cells showed a CD68+ immunostaining, the latter being variable depending on the retinal layer analyzed. In naive eyes, some Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner nuclear layer and outer plexiform layer scarcely showed a punctate CD68+ immunostaining. However, most of Iba-1+ cells with ovoid somas in the photoreceptor layer showed extended patches of CD68 immunostaining, a pattern that was observed only in some Iba-1+ cells with elongated cell bodies in this layer. In contralateral eyes CD68 immunostaining was similar to the one of naive eyes. However, amoeboid Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer displayed ample patches of CD68+ immunostaining. In **hypertensive eyes**, most Iba-1+ cells of the retina were CD68+, however, the amoeboid, rounded and the rod-like Iba-1+ cells were the ones which displayed a **more pronounced CD68+ immunolabeling**.

In addition to CD68, the macro and microglial population may exhibit other molecules related to the immune system, including the **MHC-II**. As previously mentioned, the MHC-II is required for antigen presentation to T cells. Under normal conditions, the expression of these molecules in the nervous system is very low, being microglial cells the ones which mainly express this antigen (*Gehrmann et al. 1995, Graeber and Streit 2010, Hayes et al. 1987, Streit et al. 1989*), and neither being observed in astrocytes nor in Müller cells (*Aloisi 2001, Zhang et al. 1997*). However, under virtually all inflammatory and neurodegenerative conditions, MHC-II expression significantly increases in reactive glia: microglia (*Graeber and Streit 2010, Kreutzberg 1996, Streit and Sparks 1997*), astrocytes (*Xiao and Link 1998*) and Müller cells (*Tezel et al. 2007*).

Iba-1+ cells and GFAP+ astrocytes in the retina of naive Swiss mice showed a weak constitutive expression of MHC-II molecules. In contrast, this expression was intense in

Iba-1+ cells with dendritiform morphology in the inner plexiform layer and in some perivascular Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer. In the contralateral eyes, ***after the increase in intraocular pressure, Iba-1+ cells, GFAP+ astrocytes and GFAP+ Müller cells showed up-regulation of MHC-II+ immunostaining.*** In hypertensive eyes MHC-II up-regulation in all morphological types of Iba-1+ cell was similar to the one observed in the contralateral eyes. However, MHC-II+ immunostaining differed between the macroglia population: it was up-regulated in Müller cells throughout the entire retina but not in the astrocytes.

In view of these results we ***conclude*** that:

- 1.** In albino Swiss mice laser photocoagulation of limbal structures is a reliable and reproducible method to induce ocular hypertension. This model generates sharp increases in intraocular pressure, a process which, despite its acute character, produces similar changes to the chronic ones in glaucomatous optic neuropathy.
- 2.** In the hypertensive eyes retinal ganglion cells damage occurs 15 days after the laser treatment, as signaled by NF-200+ immunostaining in the somas and dendrites of these cells.
- 3.** Both hypertensive eyes and contralateral eyes experience a gliosis of the macro and microglial populations of the retina 15 days after the laser treatment.
- 4.** In hypertensive eyes a non-proliferative astrocytic gliosis is observed. It is characterized by morphological cellular changes and by an overall increase in the GFAP expression. Müller cells also increase the GFAP expression as a sign of activation.
- 5.** In hypertensive eyes a proliferative gliosis of Iba-1+ cells, characterized by processes retraction, was observed, which correlated with the reduction of the spatial domain of these cells in the retina.
- 6.** In the contralateral normotensive eyes widespread gliosis similar to the hypertensive eyes, despite the absence of evidence of neuronal damage occurs.

7. Rod-like Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and rounded Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer are restricted exclusively to hypertensive eyes.

8. Iba-1+ cells in hypertensive eyes experience an increase of CD68 expression. Preferentially, a greater CD68 expression was found in rod-like Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and rounded Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer.

9. Both hypertensive eyes and untreated contralateral normotensive untreated eyes show a similar and widespread increase of MHC-II expression in Iba-1+ population. In GFAP+ macroglia this expression preferentially localizes in astrocytes of contralateral untreated eyes, whereas it remains restricted to Müller cells in hypertensive eyes.

10. In contralateral normotensive untreated eyes without neurodegenerative signs, MHC-II expression in Iba-1+ cells and GFAP+ astrocytes could be associated with an immune response that attempts to restore the homeostasis of the tissue. In contrast, in hypertensive eyes displaying the presence of neuronal affectation, the observed increased expression of MHC II on Iba-1+ cells and GFAP+ Müller cells could be related to a glial exacerbated reactivation associated with neurotoxic neuroinflammatory processes.

11. The increased MHC-II and CD68 expression in retinal glia and the presence of rounded mononuclear Iba-1+/MHC-II+/CD68+ cells in retinal parenchyma, that could have infiltrated from the bloodstream, appears to provide evidence for the involvement of the immune system in glaucomatous pathophysiology in this model of ocular hypertension, not only in the eyes with ocular hypertension but also in the contralateral untreated eyes.

12. In the unilateral laser induced ocular hypertension model used in the present study, resort to the contralateral eye should not be used as a control.

Organización general de la tesis

Este proyecto, que aborda la implicación de las células gliales de la retina en la neuropatía óptica glaucomatosa, arranca con una **introducción** en la que en primer lugar se hace una revisión de las células ganglionares de la retina, las principales neuronas afectadas en esta patología. A continuación, se describen las características morfológicas y funciones de los diferentes tipos de células gliales retinianas (astrocitos, células de Müller y microglía). Este apartado prosigue haciendo mención a la patología glaucomatosa y a los diferentes aspectos fisiopatogénicos asociados a esta enfermedad, entre ellos la inflamación y las células gliales. Para finalizar, se puede encontrar una breve revisión sobre algunos modelos experimentales de glaucoma empleados en roedores.

Esta introducción precede a un segundo capítulo en el que se recogen la **justificación, hipótesis y objetivos** que han inspirado este trabajo.

En el apartado **material y métodos** con el que continúa la exposición, quedan descritos todos los procedimientos experimentales necesarios para la elaboración de este trabajo, desde el desarrollo de un modelo experimental de hipertensión ocular unilateral hasta el análisis histológico final de las muestras.

A continuación en los **resultados**, se exponen de manera detallada las observaciones realizadas sobre las células ganglionares de la retina y la población glial de la retina de la muestra control y las realizadas en las mismas poblaciones celulares tras la inducción de la hipertensión ocular.

Con la misma estructuración del apartado anterior se lleva a cabo una **discusión** crítica de nuestros resultados contrastándolos con las evidencias científicas del campo.

El capítulo de **conclusiones**, en español y en inglés, recoge los puntos clave derivados de este estudio y finalmente se cierra este trabajo con la **bibliografía** empleada para su realización.

Introducción

1 Introducción

1.1 El sistema visual de los mamíferos

La **visión** en los mamíferos es uno de los sentidos más desarrollados, siendo éste de gran valor adaptativo; gracias a la visión, el individuo ha sido capaz de desarrollarse y evolucionar en un ambiente hostil. La eficacia del proceso visual, inicialmente, dependerá de la correcta interpretación del estímulo de luz como un conjunto de ondas electromagnéticas, del cual, finalmente, se podrá extraer información concisa sobre el entorno circundante. Ésta es una tarea de gran envergadura que requiere una ingente funcionalidad neuronal, tal es así que aproximadamente la mitad de la corteza cerebral humana se dedica al análisis del mundo visual (Bear et al. 1998).

1.1.1 La retina

El fenómeno de percepción visual en los mamíferos, entre ellos los roedores, comienza a nivel de la túnica o capa más interna del ojo, la retina (Figura 1.1), considerada una extensión sensorial del sistema nervioso central (SNC) que es sensible a la luz.

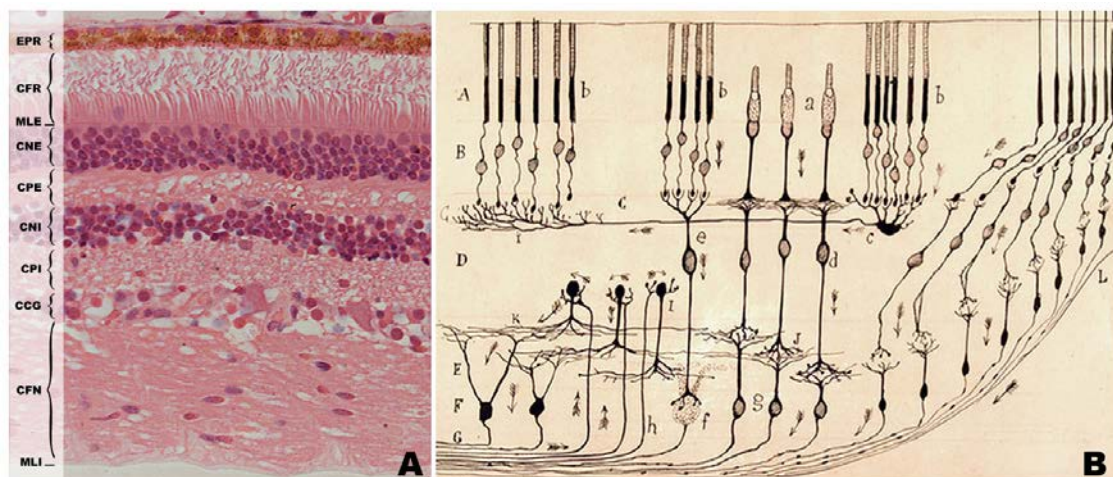


Figura 1.1. Arquitectura de la retina de los mamíferos. A: Sección histológica de una retina humana. Tinción de hematoxilina-eosina. La retina está organizada en diez estratos. Desde la región más externa a la más interna: epitelio pigmentario de la retina (EPR); capa de fotorreceptores (CFR); membrana limitante externa (MLE); capa nuclear externa (CNE); capa plexiforme externa (CPE); capa nuclear interna (CNI); capa plexiforme interna (CPI); capa de células ganglionares (CCG); capa de fibras del nervio óptico (CFN). **B: Esquema de la retina de los mamíferos por Santiago Ramón y Cajal (1901).**

La parte interna de la retina se encuentra en contacto con el vítreo y su porción más externa con la coroides. A su vez, la retina se extiende desde la cabeza del nervio óptico hasta la ora serrata. En todos los animales vertebrados, según Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) (*Ramón y Cajal 1904*), la retina está constituida por diferentes tipos celulares interconectados, tanto neuronales como no neuronales. Las neuronas de la retina comprenden los fotorreceptores, las células horizontales, las células bipolares, las células amacrinas, las células interplexiformes y las células ganglionares (CGRs). Todas ellas se encuentran organizadas estratégicamente en el tejido, gracias a lo cual se genera una estratificación de la retina en 10 niveles, los cuales se clasifican en capas nucleares y capas sinápticas. Estas son:

1. **Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR):** esta capa es la más externa de la retina limitando con la úvea, más específicamente con la membrana de Bruch de la coroides. Está constituida por una monocapa de células epiteliales con una concentración alta de melanina, a excepción de los sujetos albinos.
2. **Capa de Fotorreceptores (CFR):** se encuentra formada por los segmentos externos de los fotorreceptores, constituidos por dos tipos diferentes, los conos y los bastones. Los fotorreceptores son la primera neurona de relevo de la vía visual.
3. **Membrana Limitante Externa (MLE):** está constituida por los pies terminales de las células de Müller, localizados inmediatamente por encima de los núcleos de los fotorreceptores.
4. **Capa Nuclear Externa (CNE):** en ella se localizan los núcleos de los fotorreceptores.
5. **Capa Plexiforme Externa (CPE):** compuesta por las terminaciones sinápticas de los axones de los fotorreceptores (denominadas pedículos en el caso de los conos y esférulas en el caso de los bastones). Éstas sinaptan con las dendritas de las células bipolares (segunda neurona de relevo en la vía visual), las prolongaciones de las células horizontales y las prolongaciones de las células interplexiformes.

6. **Capa Nuclear Interna (CNI):** constituida por los núcleos de las células bipolares. En esta capa se encuentran además los núcleos de las células horizontales, las células amacrinas, las células interplexiformes y las células de Müller.
7. **Capa Plexiforme Interna (CPI):** formada por los axones de las células bipolares que sinaptan con las dendritas de las CGRs (tercera neurona de relevo en la vía visual) y con las prolongaciones de las células amacrinas.
8. **Capa de Células Ganglionares (CCG):** constituida por los núcleos de las CGRs, las células amacrinas desplazadas y por los somas de una pequeña población de células horizontales desplazadas a este estrato.
9. **Capa de Fibras del Nervio Óptico (CFN):** está formada por los axones de las CGRs.
10. **Membrana Limitante Interna (MLI):** la capa está constituida por los pies terminales de las células de Müller, que se disponen sobre una membrana basal que se encuentra en contacto directo con el vítreo.

Es en la retina donde comienza el procesamiento de las señales que darán lugar a la visión. La luz incidente en la retina, alcanza los segmentos externos de los fotorreceptores y asociado a ello se desencadenan una serie de fenómenos químicos, conocidos como fototransducción, que transforman la energía lumínica en señales eléctricas o impulsos nerviosos. Estas señales se transmiten a través de las neuronas retinianas hasta alcanzar finalmente los axones de las CGRs, los cuales se encargan de conducir la información hacia el cerebro, donde finaliza el procesamiento visual (*Bear et al. 1998*). Aunque la visión parece ser responsabilidad exclusiva de las neuronas (elementos excitables) de la vía visual, sin embargo es necesaria la presencia de otra clase de células no neuronales (elementos no excitables) en este proceso, las **células gliales o neuroglía**.

Entre las células gliales de la retina se encuentran las células de Müller y los astrocitos, que forman parte de la población macroglial, y por otro lado la microglía. La neuroglía del SNC, se localiza próxima a los somas, los axones y las terminaciones

dendríticas de las neuronas así como a los vasos sanguíneos. Aunque estas células han sido consideradas elementos pasivos dentro del sistema nervioso, sin embargo, en condiciones normales se encargan de labores vitales para la supervivencia neuronal (*Kandel et al. 2001*) e incluso están implicadas en la señalización del impulso nervioso (*Pérez-Alvarez and Araque 2013*). A pesar de que el papel de la glía pueda parecer secundario en el fenómeno de la visión, sin la glía, el cerebro, y por tanto el ojo, no podría funcionar correctamente (*Bear et al. 1998*).

1.2 Células ganglionares de la retina

1.2.1 Generalidades

Como expusimos con anterioridad, las CGRs son las últimas dentro de la vía vertical de señalización nerviosa en la retina, constituida por los fotorreceptores, las células bipolares y éstas que nos ocupan. Las CGRs se localizan mayoritariamente en la CCG y sus axones forman el nervio óptico, a través del cual viaja el impulso nervioso hacia el cerebro. En los vertebrados, entre ellos el ratón, existe una pequeña población (aproximadamente un 2%) de CGRs desplazadas a la CNI (*Doi et al. 1995a, Dräger and Olsen 1981*), conocidas como células de Dogiel (*Dogiel 1888*).

En la CCG de la retina del ratón, además de las CGRs se observan algunas células amacrinas desplazadas (*Dräger and Olsen 1981, Jeon et al. 1998, Schmidt et al. 2001*) así como una pequeña población de células horizontales desplazadas (*Silveira et al. 1989*), lo que dificulta el estudio de las CGRs mediante una simple tinción de Nissl. Tampoco el tamaño de las células generalmente ayuda a diferenciar las diferentes poblaciones en esta capa, aunque el tamaño de las células amacrinas es generalmente menor que la mayoría de las propias CGRs (*Cowey and Perry 1979, Perry and Cowey 1981*), sin embargo existe una superposición de tamaños entre las células amacrinas más grandes y las CGRs más pequeñas (*Perry and Cowey 1981*), lo que imposibilita la diferenciación entre ambas (*Villegas-Perez et al. 1988, Villegas-Perez et al. 1993*). Sin embargo, el uso de marcadores neuronales de transporte retrógrado, tales como la peroxidasa de rábano de caballo (HRP, del inglés horseradish peroxidase) o el Fluoro-Gold® (FG), han hecho posible la correcta identificación de las CGRs (*Vidal-Sanz et al.*

1987). Gracias a ello, se sabe que un 40-50% de los somas en la CCG de la retina corresponden a CGRs y el resto a los somas de otras células desplazadas a esta capa (Pang and Wu 2011). El número de CGRs en el ratón es pequeño, entre 45.000 y 65.000, lo que podría explicarse debido al tamaño diminuto de su ojo (Jeon et al. 1998, Williams et al. 1996). Sin embargo, estos animales presentan picos de densidad celular en algunas regiones del orden de 8.000 células/mm² (Dräger and Olsen 1981, Jeon et al. 1998), siendo estos valores mayores incluso que en otros roedores con ojos de mayor tamaño, entre ellos la rata (McCall et al. 1987).

Se han clasificado las CGRs del ratón (Badea and Nathans 2004, Doi et al. 1995a, Dräger and Olsen 1981, Kong et al. 2005), atendiendo a ciertas características morfológicas tales como el tamaño de sus somas o de sus dendritas (Sun et al. 2002). Aunque los primeros estudios describieron tan sólo tres o cuatro tipos de CGRs; sin embargo, en la actualidad se conocen al menos una docena diferente de estas células atendiendo al tamaño de sus somas y de la extensión y forma de las ramificaciones dendríticas (Badea and Nathans 2004, Coombs et al. 2007, Doi et al. 1995b, Jeon et al. 1998, Kong et al. 2005, Sun et al. 2002).

Los axones de las CGRs se proyectan fuera de la retina a múltiples regiones cerebrales, sin embargo, en líneas generales, éstas pueden clasificarse en función de si son áreas que contribuyen o no a la formación de la imagen (Provencio et al. 1998a). Las **regiones visuales de proyección de las CGRs** en el ratón son el colículo superior, donde se localizan la inmensa mayoría de los axones de estas células (70-97%) (Hofbauer and Drager 1985) y en menor medida, el núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo y el área pretectal. Aunque un alto porcentaje de las CGRs envían información a los centros visuales del cerebro, sin embargo, existen otras que lo hacen a **regiones no visuales**, como el núcleo supraquiasmático hipotalámico, la lámina intergeniculada del cuerpo geniculado lateral ventral del tálamo y el núcleo pretectal de la oliva (Berson 2003, Hattar et al. 2002, Hattar et al. 2006, Moore et al. 1995, Moore and Lenn 1972, Provencio et al. 1998a). Estas proyecciones no conducen a la formación de imagen sino que están asociadas con otras funciones, conocidas como “funciones extravisuales” o “funciones accesorias de la retina”.

Las funciones no visuales de la retina se corresponden con las proyecciones de los axones de un tipo de CGRs denominadas **células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles (ipRGC)** (Berson et al. 2002, Berson 2003, Berson et al. 2010, Hattar et al. 2002, Hattar et al. 2006). En el ratón, estas células constituyen un grupo reducido de CGRs, aproximadamente unas 2500 células por retina (1-3%) (Berson et al. 2010, Gonzalez-Menendez et al. 2010a, Gonzalez-Menendez et al. 2010b, Hattar et al. 2002), y actúan como un fotorreceptor gracias a la actividad de la melanopsina, pigmento homólogo a la rodopsina, presente en estas células (Gonzalez-Menendez et al. 2011, Gooley et al. 2001, Hannibal et al. 2002, Hattar et al. 2002, Hattar et al. 2003, Hughes et al. 2012, Provencio et al. 1998b, Provencio et al. 2002). Hasta la fecha, se ha propuesto que las funciones no visuales mediadas por estas células son: la sincronización del ritmo circadiano con los ciclos luz/oscuridad (Gonzalez-Menendez et al. 2009, Gooley et al. 2001, Gooley et al. 2003, Hannibal et al. 2002, Hannibal and Fahrenkrug 2002, Hattar et al. 2002, Hattar et al. 2003, Panda et al. 2002, Panda et al. 2003, Provencio et al. 2000, Rollag et al. 2003, Ruby et al. 2002, Semo et al. 2003, Warren et al. 2003), la regulación del diámetro de la pupila dependiente de la luz (Gooley et al. 2003, Hattar et al. 2003, Lucas et al. 2003, Panda et al. 2003), la supresión de la melatonina debida a estimulación lumínica (Freedman et al. 1999, Lucas et al. 2003), la supresión de la actividad motora (masking) (Mrosovsky and Hattar 2003), y la regulación de las fases de sueño/vigilia (Panda et al. 2003).

1.2.2 Marcadores de las células ganglionares de la retina

Debido a la heterogeneidad celular de la CCG, es necesario emplear técnicas alternativas para la identificación de las CGRs. Entre ellas se encuentran los trazadores neuronales, marcadores moleculares específicos para las CGRs o una combinación de cualquiera de estos junto con marcadores nucleares.

1.2.2.1 Trazadores neuronales específicos aplicados en el colículo superior o en el nervio óptico

Un método de identificación de las CGRs se basa en la aplicación de trazadores neuronales en **regiones cerebrales** diana donde proyectan estas células, como es el colículo superior. En los ratones albinos Swiss y los ratones pigmentados C57BL/6N, el 98.5% y el 96.6% respectivamente de la población total de CGRs proyectan en el colículo superior

(*Salinas-Navarro et al. 2009b*). Desde ahí estos trazadores se transportan retrógradamente por los axones retinofugales de las CGRs, acumulándose en sus somas y dendritas. Existen trazadores fluorescentes como el Fast-Blue (*Vidal-Sanz et al. 1988, Villegas-Perez et al. 1988*), el Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (*Vidal-Sanz et al. 1988*), el FG (2-ydroxystilbene-4,4-dicarboxamidine bis methanesulfonate) o su análogo, el metanosulfonato de hydroxistilbamidina (OHSt) que es una molécula pequeña con propiedades similares al FG (*Cheunsuang and Morris 2005*). Otros trazadores empleados son el isotiocianato B de rodamina (Rhodamine-B-Isothiocyanate; RITC) (*Thanos et al. 1987*), la HRP (*Vidal-Sanz et al. 1987*) o el dextrano tetrametilrodamina (DTMR) (*WoldeMussie et al. 2001*). En la actualidad el FG y el OHSt son los trazadores más empleados debido a su eficiencia y fiabilidad en el sistema visual (*Danias et al. 2006, Danias et al. 2002, Filippopoulos et al. 2006, Galindo-Romero et al. 2011, Kielczewski et al. 2005, Lebrun-Julien et al. 2009, Murphy et al. 2007, Nadal-Nicolas et al. 2009, Peinado-Ramon et al. 1996, Reichstein et al. 2007, Salinas-Navarro et al. 2009c, Salvador-Silva et al. 2000, Sanchez-Migallon et al. 2011, Selles-Navarro et al. 1996, Sobrado-Calvo et al. 2007, Villegas-Perez et al. 1996, Wang et al. 2000b, Wang et al. 2003*). Ambos son transportados retrógradamente de manera activa desde el axón terminal hacia el soma y las dendritas primarias de las CGRs donde se acumulan sin sufrir difusión transcelular (*Schmued and Fallon 1986*). Estos trazadores aparecen por primera vez en las CGRs a los 2-3 días de su aplicación en el colículo superior y alcanzan sus valores máximos a los 5-6 días; el marcaje neuronal se mantiene entre 3-4 semanas, momento tras el cual la señal fluorescente comienza a disminuir progresivamente (*Gomez-Ramirez et al. 1999, Selles-Navarro et al. 1996*).

También existen trazadores neuronales que se aplican a nivel del **nervio óptico**, donde se localizan todos los axones de las CGRs. Entre los diferentes marcadores empleados en el ratón se encuentran el DTMR que a diferencia del FG o el OHSt, difunde pasivamente por el axón sin necesidad de un transporte activo (*Salinas-Navarro et al. 2009b*). Desde la aplicación del trazador, el tiempo medio en el que las CGRs se pueden identificar es de 3 días empleando el FG o el OHSt y 2 días mediante el uso de DTMR (*Vidal-Sanz et al. 2012*).

1.2.2.2 Marcadores neuronales específicos

Las CGRs pueden también identificarse mediante la inmunodetección de proteínas específicas, entre ellas la proteína asociada a los microtúbulos 1A (microtubule-associated protein 1A; MAP1A) (McKerracher et al. 1989), γ -synuclein (Soto et al. 2008, Surgucheva et al. 2008), Bex1/2 (Bernstein et al. 2006), Thy-1 (Barnstable and Drager 1984, Casson et al. 2004b, Chidlow et al. 2005), NeuN (Buckingham et al. 2008), Brn3a (Nadal-Nicolas et al. 2009, Quina et al. 2005, Weishaupt et al. 2005) y Brn3b (Fu and Sretavan 2010).

Entre las más empleadas, el Thy1 es un antígeno específico de las CGRs (Casson et al. 2004a, Chidlow et al. 2005), aunque se encuentra también en las células de Müller *in vitro* (Schlamp et al. 2001), y característicamente desciende su expresión en presencia de daño neuronal. El Brn3a es un factor de transcripción de la familia de dominios POU y ha sido útil para el reconocimiento de la mayoría de la población de CGRs de los ratones (Galindo-Romero et al. 2011). En el adulto el Brn3a es un indicador indirecto de la funcionalidad de las CGRs, ya que su expresión desciende tras la lesión neuronal (Agudo et al. 2008, Agudo et al. 2009, Nadal-Nicolas et al. 2009).

1.2.2.3 Marcadores axonales: anticuerpos contra los neurofilamentos

Los NFs son las proteínas fundamentales del citoesqueleto de las neuronas maduras y son responsables de mantener la conducción de la señal nerviosa. Atendiendo a su peso molecular, están formados por tres subunidades, las altas (H), medias (M) y bajas (L). Los NFs son muy abundantes a nivel de los axones y en ellos se localizan de manera dispersa o formando haces (Wuerker and Kirkpatrick 1972) dispuestos paralelos ininterrumpidamente al eje del axón, aunque se hacen discontinuos a nivel de los nodos de Ranvier (Tsukita et al. 1981).

Las proteínas de los NFs están muy fosforiladas, aunque el nivel en que lo están varía dependiendo de su localización. En condiciones normales, la distribución de las isoformas fosforiladas y no fosforiladas de las neuronas difiere dentro de una misma célula; las isoformas no fosforiladas se observan predominantemente en el soma, las dendritas primarias y la región del axón más proximal de las neuronas. Sin embargo, los NFs

experimentan una gran fosforilación post-translacional cuando la proteína se transporta desde el soma hasta el axón (Nixon and Lewis 1986) y por ello las isoformas fosforiladas están presentes principalmente en los axones (Sternberger et al. 1985). Sin embargo, ante diversas situaciones anómalas, los NFs sufren cambios, siendo uno de los más habituales la fosforilación. La fosforilación, en particular la de los NFs-H, se ha asociado a una disminución de la velocidad de transporte axonal (Jung and Shea 1999, Perrot et al. 2008). Además, ante determinadas patologías neurodegenerativas y otros daños neuronales (Buckingham et al. 2008, Dieterich et al. 2002, Soto et al. 2008, Soto et al. 2011), se produce una distribución anormal de estos NFs fosforilados de alto peso molecular (pNFH) en los somas celulares y en las dendritas proximales de las CGRs (Balkema and Drager 1990, Dieterich et al. 2002, Drager and Hofbauer 1984, Silveira et al. 1994, Soto et al. 2008, Soto et al. 2011, Vidal-Sanz et al. 1987, Villegas-Perez et al. 1988). También se ha observado una disminución en los niveles de ARNm de los NFs tras diferentes tipos de lesiones retinianas tales como la axotomía del nervio óptico, la isquemia o la excitotoxicidad (Agudo et al. 2008, Chidlow et al. 2005, Hoffman et al. 1993, McKerracher et al. 1990) lo cual podría asociarse a un deterioro celular progresivo.

Debido a todo lo anterior, los anticuerpos que detectan los NFs fosforilados de alto peso molecular, como son el NF-200 y el RT97, son marcadores indirectos específicos de CGRs supervivientes pero dañadas (Balkema and Drager 1985, Drager and Hofbauer 1984, Garcia-Ayuso et al. 2010, Garcia-Ayuso et al. 2011, Marco-Gomariz et al. 2006, Parrilla-Reverter et al. 2009, Vidal-Sanz et al. 1987, Villegas-Perez et al. 1988, Villegas-Perez et al. 1996, Villegas-Perez et al. 1998, Wang et al. 2000b, Wang et al. 2003), ya que no marcan las células amacrinas desplazadas a la CCG (Drager and Hofbauer 1984, Kong and Cho 1999).

1.3 Células gliales

1.3.1 Antecedentes y generalidades

A lo largo de la historia la glía ha sido descrita, hasta no hace mucho, como un elemento pasivo del sistema nervioso. La idea original de la coexistencia de elementos activos (excitable) y pasivos (no excitables) en el sistema nervioso, apareció en 1836 gracias

al suizo **Gabriel Gustav Valentin** (1810–1883) y a su libro “*Über den Verlauf und die letzten Enden der Nerven*” (Valentin 1836).

En 1824, el francés **Rene Dutrochet** (1776-1847) ya dejaba reflejado que existían unas pequeñas estructuras globulares que acompañaban a los grandes componentes del sistema nervioso de los moluscos (Dutrochet 1824); sin embargo, el inicio exacto de la terminología glía es confuso y controvertido. En un artículo de **Rudolf Virchow** (1821-1902) de 1846 sobre el cerebro y la médula espinal del humano titulado “*Über das granulierte Aussehen der Wandungen des Gehirnventrikels*” (Virchow 1846), Virchow observó la presencia de una sustancia amorfa intersticial compuesta por unas fibrillas que rodeaba a las neuronas y a lo que denominó “*Nervenkitt*”. Posteriormente, en 1856 en una recopilación de sus trabajos titulada “*Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*” (Virchow 1856), hizo referencia de nuevo a este artículo y utilizó el término “glía” por primera vez. Su libro “*Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*” en 1858 (Virchow 1858) está considerado como el debut del campo de estudio de las células gliales; no obstante, para Virchow la glía en aquel momento era un mero tejido conjuntivo desprovisto de presencia celular.

En este intervalo de tiempo en el que Virchow perfilaba sus conocimientos sobre el sistema nervioso, **Heinrich Müller** (1820-1864) en 1851, capturó la primera imagen de una célula glial, hoy conocida como célula de Müller de la retina (Müller 1851) que **Max Schultze** (1825-1874) describiría en detalle años después (Schultze 1859). Siguiendo los pasos de Virchow, **Karl Bergmann** (1814-1865) en 1857 describió unas estructuras fibrosas localizadas en el cerebelo, a las que dio el nombre de *células gliales de Bergmann* en su artículo “*Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und Rückenmarks*” (Bergmann 1857).

En 1865, sumándose a las descripciones del momento, **Otto Deiters** (1834-1863) identificó unos cuerpos celulares ramificados no neuronales en la médula espinal y el cerebro tanto de humanos como de otros mamíferos (Figura 1.2), a las que denominó *células de Deiters* en su libro “*Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark*” en 1865 (Deiters and Schultze 1865). El aspecto de estas células era similar a lo que hoy está descrito

como astrocitos y probablemente las imágenes de Deiters sean las primeras de astrocitos en el cerebro (Figura 1.2). Algunos años más tarde, en 1869 **Jacob Henle** (1809-1885) y **Merkel Friedrich** (1845-1919) describieron por primera vez unas redes formadas por unas células de aspecto estrellado, posiblemente astrocitos, tanto en la sustancia gris como en la materia blanca de la médula espinal en su trabajo “*Ueber die sogenannte Blindesubstanz der Central-organe des Nervensystems*” (Henle and Friedrich 1869).

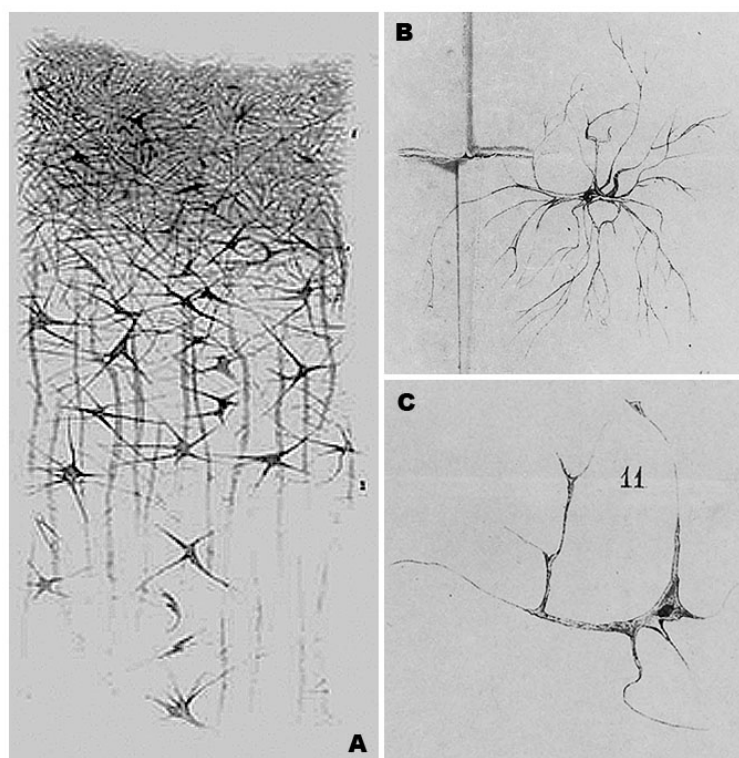


Figura 1.2. A: redes gliales descritas por Jacob Henle. [Tomada de (Henle and Friedrich 1869)]. **B: células gliales de Deiter.** [<https://wiki.brown.edu/confluence/display/BN0193S04/Deiters>].

Desde este momento, de la mano de autores como **Camilo Golgi** (1843-1926), y gracias al desarrollo de nuevas técnicas de tinción, se sucedieron importantes avances en el campo de la neuroglía. En 1873 Golgi (Golgi 1873) dio a conocer su **método de impregnación argéntica** (la “reazione nera”), mediante el cual se observaba la morfología completa de las neuronas (Torres-Fernández 2006). Con este método, Golgi llevó a cabo diversos estudios sobre la estructura histológica del sistema nervioso poniendo de manifiesto los diferentes tipos de células gliales del cerebro, las relaciones entre ellas y con los vasos sanguíneos (Pannese 1999).

Complementariamente a los hallazgos de Golgi, en 1893, **William Lloyd Andriezen** (1870-1906) en su trabajo "*The neuroglia elements in the human brain*", describió dos tipos de glía diferentes: la glía fibrosa localizada en la sustancia blanca principalmente, y la protoplasmática en la sustancia gris (Andriezen 1893).

Aunque en los trabajos previos se había observado la existencia de unas células de aspecto estrellado, en 1895 **Michael van Lenhossek** (1863-1937), en la segunda edición de su trabajo "*Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuerer Forschung*" (Lenhossék 1895), fue el responsable de acuñar el término *astrocito* para definir este tipo de células gliales.

Al final del siglo XIX fueron múltiples las apuestas sobre las posibles funciones de las células gliales; Golgi las responsabilizaría de la nutrición neuronal dado su íntimo contacto vascular y nervioso; y otros, entre ellos **Carl Weigert** (1845-1904) en 1895, la considerarían una célula con funciones meramente estructurales (Verkhatsky and Butt 2007). Sin embargo, la idea de una interacción activa entre las células gliales y las neuronas vino de la mano de **Carl Ludwig Schleich** (1859-1922) quien postuló en su libro "*Schmerzlose Operationen*" (Schleich 1899) que ambas células participaban en la transmisión nerviosa, bien conduciendo la señal (neuronas) o promoviendo la viabilidad de la misma (glía). El siglo XIX, a pesar de las múltiples aportaciones que hizo al campo de la neuroglía, fue un periodo lleno de controversia y desconocimiento.

Durante los primeros años del siglo XX, la arquitectura neuronal quedaba descrita gracias a los trabajos de Santiago Ramón y Cajal. En la recopilación de su trabajo, publicado bajo el nombre de "*La textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*" (Ramón y Cajal 1899, Ramón y Cajal 1904), quedaba dilucidada la arquitectura del sistema nervioso en torno a los postulados básicos de independencia neuronal, la génesis de las células nerviosas y la explicación del funcionamiento estructural del sistema (Baratas 2006, López-Piñero 2006); sin embargo aún se mantenían sin resolver numerosas incógnitas sobre la neuroglía.

En la primera mitad del siglo XX, bajo la sombra de la figura de Santiago Ramón y Cajal, se desarrollaron en España dos generaciones de histopatólogos encabezadas por **Nicolás Achúcarro** (1881-1918), y posteriormente a su muerte, por su más fiel discípulo, **Pío del Río-Hortega** (1882-1945) quien continuó su labor convirtiéndose, después de Santiago Ramón y Cajal, en el miembro más destacado de la Escuela Histológica Española (López-Piñero 2006, López-Sánchez 2012). Gracias a la evolución de las técnicas de tinción celular y a la participación principalmente de Cajal, Achúcarro, y Del Río Hortega, en la primera mitad del siglo XX, se establecieron las bases para el reconocimiento de la estructura completa de la población glial.

Las variaciones de la técnica de Golgi mejoraron el conocimiento de la población glial. De esta forma en 1911 **Nicolás Achúcarro** desarrolló la **técnica del tanino de plata amoniacal** (Achúcarro 1911a), que puso de manifiesto la neuroglía y la sustancia fundamental del tejido conectivo. Con este método se observaba la morfología completa de la célula glial, donde sus ramificaciones periféricas formaban un plexo discontinuo entre los haces de fibras nerviosas (Achúcarro 1911b).

Sin embargo, este método de tinción no era capaz de proporcionar resultados firmes, lo que llevó a Achúcarro a recurrir a Cajal quien, tras no pocas pruebas, consiguió desarrollar en 1913 su **técnica del oro sublimado** (Ramón y Cajal 1913a, Ramón y Cajal 1913b). Con esta metodología Cajal consiguió impregnar la neuroglía en su totalidad. Sería considerada la técnica más apropiada para la coloración de este tipo celular y gracias a ella Cajal llevó a cabo una primera clasificación de la glía del SNC (Ramón y Cajal 1916):

- **neuroglía fibrosa** o astrocitos de radiaciones largas, en la sustancia blanca,
- **neuroglía protoplasmática** o astrocitos de radiaciones cortas y vellosas, en la sustancia gris, y
- el **tercer elemento**, o corpúsculo adendrítico.

El **tercer elemento** había sido descrito por Cajal como una variedad diferente neuroglial constituida por “*células pequeñísimas, redondeadas, de contorno tuberoso, a veces ornado de protuberancias o apéndices breves*” (Ramón y Cajal 1913b). Este elemento no

se observaba mediante la tinción del oro sublimado, sino exclusivamente con su **método de formol-urano**, desarrollado a base de mejoras de las técnicas de impregnaciones argénticas de Golgi, aunque con claras deficiencias, ya que no se reconocían las expansiones celulares. Estas descripciones coincidían con lo que Achúcarro había designado “*células intersticiales del tejido nervioso desconocido*”. La forma de interpretar los resultados referentes al tercer elemento fue controvertida. Por una lado, algunos autores como Bevan, Lewis, Nissl, Robertson, Bonome, Schaper o Rosental entre otros, defendían la existencia de un tipo de glía germinal indiferenciada, exenta de expansiones, coincidiendo con Ramón y Cajal; sin embargo, otros autores como Held, Alzheimer, Ficandt, Jakob y Lugaro entre otros, aludían la ausencia de ramificaciones a deficiencias en las técnicas de marcaje y que por tanto en realidad debían ser ramificadas como el resto de elementos neurogliales descritos (del Río Hortega 1919a, López Enríquez 1927, Ramón y Cajal 1913b).

Empleando el método del oro sublimado, Achúcarro emprendió un estudio minucioso sobre la neuroglia, que le llevó a acuñar el término de “*glioarquitectura*” (Achúcarro 1914, Achúcarro and Gayarre 1914a, Achúcarro 1913, Achúcarro and Gayarre 1914b). Los esfuerzos por realizar avances significativos en la exploración de la glía fue el último gran servicio que Achúcarro rindió a su laboratorio antes de su muerte prematura en 1918 y fue, sin duda, la herencia más valiosa que dejó a su discípulo, Pío del Río-Hortega (López-Sánchez 2012).

Desde 1916 hasta 1928, dentro del Laboratorio de Histopatología del Sistema Nervioso, **Pío del Río-Hortega** dedicó su esfuerzo investigador al campo de la neuroglia, aportando hallazgos destacados que le convertirían en un referente dentro de la neurohistología. La primera gran contribución de del Río-Hortega fue el desarrollo de la **técnica del carbonato de plata amoniacal** en 1918 (del Río Hortega 1918a). Ésta surge de modificaciones de la técnica del tanino argéntico de Achúcarro, y le permitió teñir aquellos elementos de la neuroglía que habían escapado al microscopio. Ligeras variaciones de esta nueva técnica, dieron lugar a su publicación “*Sobre la verdadera significación de las células neuróglícas llamadas amiboides*” (del Río Hortega 1918b), en la cual discutía la dudosa implicación fagocítica de los astrocitos en los procesos inflamatorios y destructivos del

tejido nervioso. Estas células “*amiboides*” habían sido descritas por otros histólogos como Alzheimer o Achúcarro, quienes defendían que estas células no habían sido marcadas por los métodos corrientes de neurofibrillas ni por ninguna de sus modificaciones. Este hecho abría un camino hacia el descubrimiento de un nuevo tipo celular. Finalmente, el método del carbonato de plata amoniacal puso de manifiesto unas células con apéndices ramificados diseminadas perineuronamente, a las que del Río-Hortega denominaría “*microglía*”. Durante el periodo comprendido entre 1918 y 1921, del Río-Hortega publicó una serie de trabajos en los que se ponía de manifiesto la naturaleza y funcionalidad de la microglía (*del Río Hortega 1919b, del Río Hortega 1919c, del Río Hortega 1919d, del Río Hortega 1919e, del Río Hortega 1920, del Río Hortega 1921a, del Río Hortega 1921b, del Río Hortega 1921c, del Río Hortega 1924*). En ellos, en 1919 del Río-Hortega defendía la entidad microglial como el verdadero componente del tercer elemento descrito por Cajal, aventurándose en 1920 a lanzar la hipótesis de un posible origen mesodérmico de la microglía, a diferencia del resto de neuroglía, la cual sería confirmada posteriormente por él mismo. Este posible origen, hizo que del Río-Hortega terminara denominando a esta célula como “*mesoglia*” (*del Río Hortega 1920*).

En el mismo trabajo, del Río-Hortega hizo un inciso sobre las células apolares o “*cuerpos adendríticos*” de la sustancia blanca, descritas por Cajal como el tercer elemento. La “*glía interfascicular*”, como del Río-Hortega denominó a estas células, se observaba distribuida entre los haces nerviosos, agrupadas en columnas o paquetes con expansiones más o menos desarrolladas, pero sin parecido morfológico alguno a la microglía. En 1920, del Río-Hortega confirmó que “*la glía interfascicular parece ser un tercer tipo de neuroglía de origen epitelial*” y sugirió que esta entidad era comparable a las células de Schwann. Fue en 1921, tras analizar más detalladamente lo que había descrito previamente como “*glía interfascicular*”, cuando definió por primera vez el término de “*oligodendroglía*” o “*glía de escasas ramificaciones*”, para referenciarse a lo que Cajal había designado en 1913 como “*elementos adendríticos*” (*del Río Hortega 1921a, del Río Hortega 1928*). De manera concluyente gracias a los estudios de del Río-Hortega, el panorama del tercer elemento de Cajal, eliminada la suposición de ser adendrítico, quedaba modificado en virtud de la diferenciación de dos estirpes celulares completamente diferentes e inconfundibles:

- **la microglía**, una célula de pequeño tamaño y de origen aparentemente mesodérmico, lo que se consideró desde entonces como el tercer elemento y
- **la oligodendroglía**, una célula de escasas radiaciones de probable origen ectodérmico y con similitudes, en cuanto a origen y funciones, a la neuroglia descrita hasta este momento

El método del carbonato de plata amoniacal y el descubrimiento de la microglía, no fueron hechos bien recibidos por Cajal, lo que desencadenó un abierto enfrentamiento entre Cajal y del Río-Hortega. Una de las consecuencias del difícil trato entre ambos, fue el hecho de que en 1920 Cajal, en un desconcertante trabajo (*Ramón y Cajal 1920*), quisiera desproveer a del Río Hortega del descubrimiento de la microglía, asignando el mismo al neurólogo irlandés William Ford Robertson. Éste, en 1900 había definido de manera poco clara lo que denominó “mesoglia cells”, que posteriormente del Río Hortega dejaría constancia de que tales células no tenían un origen mesodérmico y que se correspondían, en su mayor parte, con los tipos pequeños de oligodendroglía (*Riera and del Río-Hortega 2004*). Posteriormente en 1923 Cajal, reconocía su error en la atribución del descubrimiento a Robertson “... Pero es preciso reconocer que la revelación de la generalidad de este corpúsculo microglial y la descripción de las diversas formas que adopta en el cerebro se debe a Río-Hortega, el cual ha puesto de manifiesto sus fases evolutivas y su origen leucocítico...” (*Ramón y Cajal 1923*).

Tal relevancia alcanzaron las aportaciones de del Río-Hortega, que pronto pasó a ser un renombrado autor a nivel nacional e internacional (*del Río Hortega 1930, del Río Hortega 1932, del Río Hortega 1939, del Río Hortega et al. 1943, del Río Hortega and Penfield 1927*). En 1924 un claro ejemplo de ello fue la aparición del término “*células de Hortega*” para designar a la microglía en un artículo publicado por Spatz y Metz donde confirmaban la exactitud de las descripciones de del Río-Hortega (*Metz and Spatz 1924*).

De esta forma, a comienzos del siglo XX quedaron definidos tres tipos diferentes de células gliales del SNC: los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos.

En relación a la retina, los estudios en los vertebrados de Ramón y Cajal en 1892 (*Ramón y Cajal 1892*) pondrían de manifiesto por primera vez la presencia en la retina de astrocitos fibrosos. En 1926 Marchesani (*Marchesani 1926*) observó en la retina los tres elementos principales neurogliales descritos hasta el momento en el SNC: los astrocitos, la oligodendroglía y la microglía. Entre 1926-1927 López Enriquez (*López Enriquez 1926, López Enriquez 1927*), otro miembro de la escuela Cajaliana y discípulo directo de del Río-Hortega, aportaría nuevas evidencias sobre la presencia de oligodendroglía y células microgliales en la retina normal y patológica. Sin embargo, sería Polyak (*Polyak 1941*) en sus estudios en primates quien en 1941 afirmase que en las retinas de éstos se observaban unas fibras radiales de Müller, astrocitos y microglía, sin embargo no existían evidencias de oligodendroglía.

A posteriori, el desarrollo de nuevas técnicas de tinción, el uso de la microscopía electrónica en la década de 1960 y la utilización de las técnicas inmunohistoquímicas desarrolladas por Nakane (*Nakane and Pierce 1966*) y Sternberger (*Sternberger et al. 1970*), han permitido profundizar en el estudio morfológico y funcional de las células gliales y su implicación en los procesos patológicos.

1.3.2 Células macrogliales de la retina: los astrocitos y las células de Müller

1.3.2.1 Astrocitos

1.3.2.1.1 Generalidades

Los astrocitos son la población mayoritaria de células gliales en el SNC. Su origen es neuroectodérmico sin embargo, a diferencia de las neuronas, son células no excitables, aunque participan activamente en la transmisión de la señal nerviosa (*Pérez-Alvarez and Araque 2013*).

Los astrocitos, en base a sus características morfológicas y a su localización, se han clasificado en protoplasmáticos y fibrosos (*Ramón y Cajal 1909*). Los **astrocitos de tipo protoplasmático** (Figura 1.3) se encuentran distribuidos en la sustancia gris, poseen

múltiples prolongaciones, de las cuales emergen otras prolongaciones más finas, cortas y numerosas, que dotan a la célula de un aspecto globoso. Por el contrario, los **astrocitos de tipo fibrosos** (Figura 1.3) se encuentran en la materia blanca y presentan largas prolongaciones poco ramificadas que se extienden desde el soma celular (Ramón y Cajal 1909). A pesar de esta clasificación, existe una amplia heterogeneidad astrocitaria ya que son capaces de adaptar su morfología en función de su localización y de otros factores (Ramírez-Exposito and Martínez-Martos 1998).

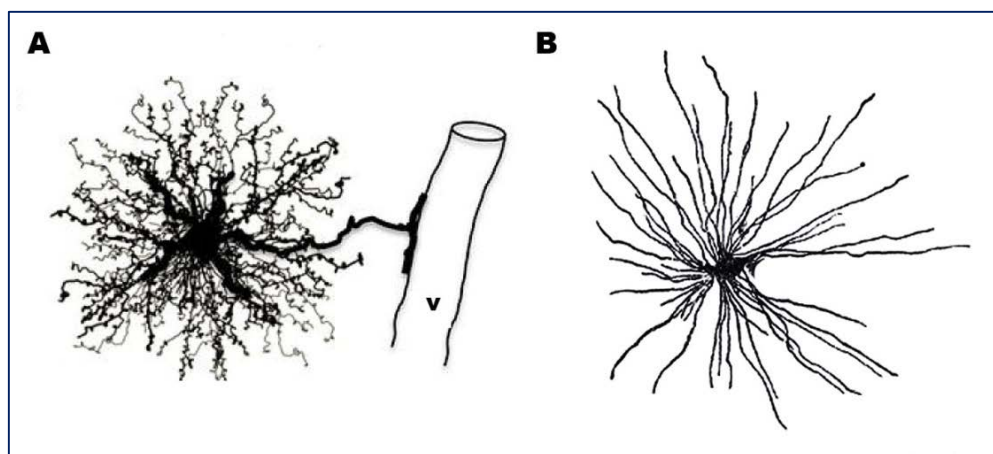


Figura 1.3. **A:** astrocito protoplásmico de la sustancia gris del sistema nervioso del que emerge una gran cantidad de prolongaciones finas y otra tosca que contacta con un vaso sanguíneo (v). [Tomada de Sofroniew and Vinters 2010]. **B:** astrocito fibroso de la sustancia blanca del sistema nervioso del que emergen largas prolongaciones poco ramificadas. [Modificada de Andriezen 1893].

En la retina humana, tanto los estudios iniciales mediante las técnicas de plata como los estudios ultraestructurales e inmunohistoquímicos más recientes, han coincidido en localizar a los astrocitos en las capas más internas de la retina; sus somas se encuentran mayoritariamente en la CFN y la CCG (Ramírez et al. 1994, Ramón y Cajal 1892, Triviño et al. 1990), y de manera muy escasa también puede aparecer alguno en la CPI (Ramírez et al. 1994, Wolter 1955a, Wolter 1955b, Wolter 1956, Wolter 1959, Wolter 1961). Las prolongaciones se distribuyen de manera similar a cómo lo hacen sus somas dentro de la retina, sin embargo éstas pueden alcanzar la CPI (Polyak 1941, Ramírez et al. 1998b, Ramón y Cajal 1892, Wolter 1955a, Wolter 1955b, Wolter 1956, Wolter 1959, Wolter 1961) y la CNI (Ramírez et al. 1998b, Wolter 1955a, Wolter 1955b, Wolter 1956, Wolter 1959, Wolter 1961). En roedores como la rata (Dixon and Eng 1981, Ramírez et al. 1998a)

o el ratón (*Bromberg and Schachner 1978*) la localización de los astrocitos coincide en gran medida con la observada en la retina humana (*Dixon and Eng 1981*).

Los astrocitos en la retina se encuentran en relación bien con los axones de las CGRs (*Triviño et al. 1990*), bien con los vasos sanguíneos (*Triviño et al. 1992*). Probablemente debido a esta estrecha asociación entre las estructuras vasculares y los astrocitos, éstos sólo se encuentren presentes en los mamíferos con retinas vascularizadas (*Stone and Dreher 1987, Triviño et al. 1997*) y en ellas, sólo en las zonas con presencia de vasos, estando ausentes tanto en la fovea como en la zona más próxima a la ora serrata (*Ikui et al. 1976*). Las prolongaciones astrocitarias se extienden por toda la retina formando una estructura regular en forma de red, en la que las prolongaciones de los astrocitos vecinos están interconectados por uniones gap (*Peters et al. 1991, Ramírez et al. 1996*).

1.3.2.1.2 Principales funciones de las células astrocitarias

Los astrocitos desempeñan funciones esenciales dentro del sistema nervioso tanto en condiciones fisiológicas como en el curso de diferentes patologías, siendo responsables de señales críticas en la muerte o supervivencia neuronal.

1.3.2.1.2.1 Neurogénesis y sinaptogénesis

Aunque generalmente los astrocitos maduran de forma más tardía que las neuronas, éstos están implicados en la **neurogénesis** del SNC durante el desarrollo embrionario (*Song et al. 2002*). Al menos en la región hipocampal y en los ventrículos laterales, los astrocitos son capaces de promover la génesis del tejido nervioso a partir de precursores neuronales embrionarios. Estos precursores, presentan características astrocitarias, como la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) y la presencia de uniones gap, y permanecen activos durante toda la vida (*Doetsch et al. 1999, Garcia et al. 2004, Imura et al. 2003, Lim and Alvarez-Buylla 1999, Oh et al. 2009, Recknor et al. 2006, Seri et al. 2001, Song et al. 2002, Svendsen 2002*).

Los astrocitos juegan un papel activo en la **formación de sinapsis o sinaptogénesis** (*Pfriegeer 2002*). Los estudios de microscopía electrónica han demostrado cómo las

prolongaciones de los astrocitos protoplasmáticos envuelven la región sináptica, y cómo las de los astrocitos fibrosos se disponen en contacto con los nódulos de Ranvier (*Peters et al. 1991*). La sinaptogénesis es un proceso dependiente de una ingente cantidad de colesterol, que las neuronas obtendrían a través de los astrocitos. Asimismo, los astrocitos son también responsables de promover la maduración de estas sinapsis mediante la producción y la liberación de sustancias tales como el TNF- α y el factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF) (*Goritz et al. 2005, Pfrieder 2002*). Los astrocitos también regulan la plasticidad de las sinapsis neuronales tanto en el desarrollo embrionario como en el sistema nervioso adulto (*Christopherson et al. 2005, Ullian et al. 2001, Ullian et al. 2004*). Esto podría explicar por qué los cultivos de neuronas en ausencia de células gliales, tienen una baja capacidad para formar sinapsis.

1.3.2.1.2.2 Formación de la barrera hematoencefálica o hematorretiniana

La **barrera hematoencefálica** es una estructura que limita el intercambio de moléculas entre el torrente sanguíneo y el parénquima nervioso, en función de su tamaño y polaridad (*Abbott et al. 2006, Ballabh et al. 2004*). Los principales elementos que componen esta última son: las células endoteliales de los capilares, los pericitos perivasculares y los pies terminales o podocitos de los astrocitos (Figura 1.4). Esta barrera media en diferentes funciones, entre ellas: la nutrición del sistema nervioso, la evacuación de productos de desecho tisular, el flujo de iones, así como servir de sistema de defensa. En la retina, esta barrera recibe el nombre de **hematorretiniana**.

Los astrocitos sirven de soporte físico a las estructuras vasculares con las que se relacionan. A través de los podocitos los astrocitos secretan heparán sulfato, laminina y fibronectina, que son integrantes fundamentales de la lámina basal de las barreras hematoneurales. Además, los astrocitos secretan sustancias como el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β), el factor neurotrófico de la línea celular glial (GDNF) (*Abbott et al. 2006, Igarashi et al. 1999*) o el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), que participan *in vitro* en la expresión de transportadores de las células endoteliales y contribuyen a las uniones estrechas (*Lee et al. 2003*). Todo ello evidencia la participación de estas células gliales, de manera directa o indirecta, en la formación de dichas barreras.

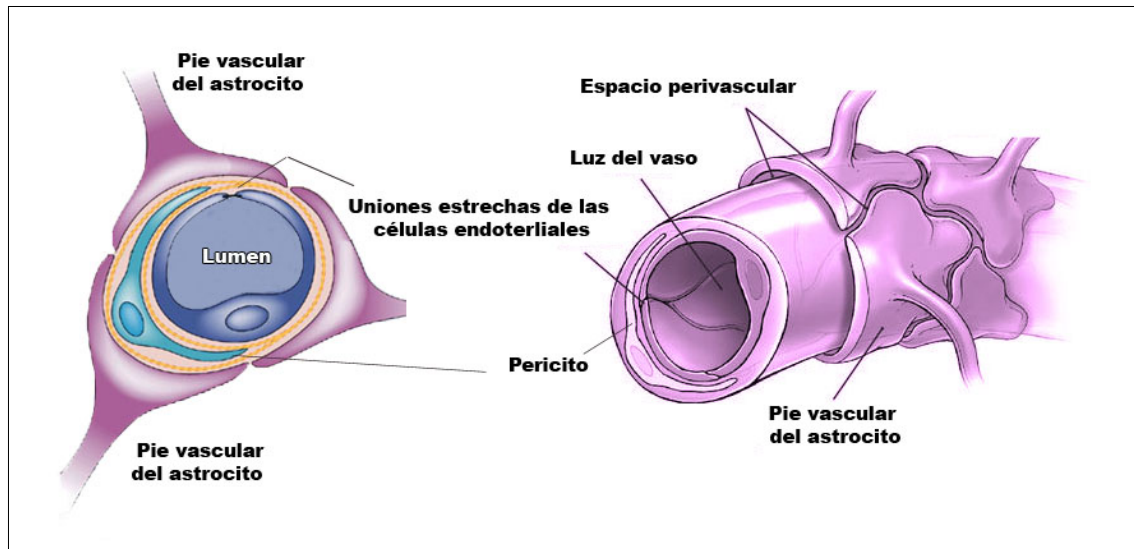


Figura 1.4. Esquema de la barrera hematorretiniana. Las células endoteliales de los capilares, los pericitos perivascuales y los pies terminales o podocitos de los astrocitos son los principales elementos que componen la barrera hematorretiniana. [Modificadas de Abbott et al. 2006 y Anderson et al. 2011].

1.3.2.1.2.3 Regulación del metabolismo energético

Todas las funciones neuronales requieren una ingente cantidad energética. Por ello, la localización de las prolongaciones de los astrocitos entre las neuronas y los vasos sanguíneos va a ser determinante en el **soporte energético** de las neuronas (Brown and Ransom 2007, Peters et al. 1991). El contacto directo de los astrocitos con los vasos sanguíneos va a permitir captar la glucosa desde el torrente sanguíneo, gracias a los transportadores de glucosa GLUT1. La glucosa, una vez captada por los astrocitos será metabolizada a lactato y transportada directamente a las neuronas, o bien almacenada por los propios astrocitos en forma de glucógeno, que podrá ser usado ante situaciones de hipoglucemia o de alta actividad neuronal (Brown and Ransom 2007, Raivich et al. 1999, Ramirez-Exposito and Martinez-Martos 1998, Suh et al. 2007).

1.3.2.1.2.4 Mantenimiento de la homeostasis extracelular

Las redes celulares que forman los astrocitos entre sí parecen ser responsables de disipar rápidamente moléculas pequeñas, tales como el ión potasio (K^+) y el glutamato, evitando así su acumulación extracelular, que podría ser potencialmente perjudicial (Seifert et al. 2006). Los astrocitos mantienen la homeostasis de los fluidos, de los iones, y por tanto

regulan el pH del medio; igualmente controlan los niveles extracelulares de neurotransmisores, lo que es fundamental para una buena transmisión sináptica.

Las prolongaciones de los astrocitos tienen abundantes canales de agua denominados acuoporinas, en particular las de tipo 4 (Seifert et al. 2006, Simard and Nedergaard 2004, Zador et al. 2009), especialmente en las prolongaciones que se encuentran en contacto con los vasos sanguíneos. Este hecho juega un papel fundamental en la regulación de la **homeostasis de los fluidos** en condiciones fisiológicas, y se encuentra envuelto en la formación de edemas citotóxicos en diferentes patologías, entre ellas la retinopatía diabética (Sofroniew and Vinters 2010).

Los astrocitos modulan diferentes gradientes iónicos de membrana como el del cloro (Cl^-), sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}), participando en la **homeostasis iónica** y por tanto en el mantenimiento de del pH del medio (Verkhratsky and Steinhauser 2000). Por otro lado, la actividad sináptica es consecuente con un incremento de iones K^+ . Una concentración óptima de K^+ extracelular es responsable de mantener el potencial de membrana neuronal, de la liberación de neurotransmisores y del metabolismo glucídico entre otras y por tanto de la funcionalidad neuronal (Kofuji and Newman 2004). Los astrocitos tienen una gran cantidad de transportadores de K^+ (Seifert et al. 2006, Simard and Nedergaard 2004), siendo éstos muy numerosos en los podocitos que contactan con los vasos sanguíneos, por lo que el K^+ captado por estas células es evacuado del tejido a través de las estructuras vasculares (Kofuji and Newman 2004, Simard and Nedergaard 2004). Además, como producto final del metabolismo oxidativo de las neuronas, aparece en el medio extracelular una corriente continua de dióxido de carbono (CO_2). Los astrocitos son los responsables de eliminar este exceso de CO_2 gracias a la anhidrasa carbónica (Deitmer 2001) la cual degrada los productos de la oxidación de la glucosa, CO_2 y agua (H_2O), en bicarbonato (HCO_3^-) y protones (H^+). Los productos de esta reacción, los H^+ y el HCO_3^- , se deben eliminar ya que su acumulación podría revertir la reacción y dar como resultado la formación nuevamente de CO_2 . Para ello, los astrocitos presentan varios tipos de transportadores iónicos, entre ellos el

cotransportador de $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ y un intercambiador de $\text{Na}^+\text{-H}^+$, gracias a los cuales, el ión HCO_3^- y los H^+ salen del tejido hacia el torrente sanguíneo (Deitmer 2001).

El glutamato es el neurotransmisor esencial en el SNC, sin embargo, las neuronas son especialmente sensibles a altas concentraciones de estas moléculas. Un exceso de glutamato en el medio podrá provocar la despolarización neuronal, que será consecuente de la disregulación del Ca^{2+} intracelular y por tanto de una posible muerte celular. Los astrocitos juegan un papel fundamental en la **homeostasis de los neurotransmisores**. Las prolongaciones de los astrocitos tienen una gran cantidad de transportadores de glutamato y de otros neurotransmisores, entre ellos el ácido g-aminobutírico (GABA) y la glicina, encargados de eliminar el exceso de éstos del espacio sináptico (Sattler and Rothstein 2006, Seifert et al. 2006). Tras su recaptación, mediante actividad enzimática se obtienen ciertos precursores, como la glutamina por acción de la glutamina sintetasa, que son devueltos al espacio sináptico reconvertidos en neurotransmisores activos.

El estrés oxidativo ligado a la aparición de especies reactivas de oxígeno en el tejido lleva asociado un daño neuronal. Los astrocitos poseen potentes **funciones antioxidantes**; secretan antioxidantes de bajo peso molecular como el glutatión, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, y de igual manera tienen concentraciones elevadas de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa (Chen and Swanson 2003). Estos mecanismos constituyen la defensa celular contra el estrés oxidativo de las neuronas en patologías del sistema nervioso, relacionadas esencialmente con un componente isquémico (Dringen 2000). Se ha visto cómo en cocultivos de neuronas y astrocitos, éstos últimos son capaces de proteger a las neuronas de la muerte en presencia de sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno (Desagher et al. 1996, Wilson 1997).

1.3.2.1.2.5 Modulación de la transmisión sináptica

Aunque clásicamente los astrocitos se han considerado elementos pasivos en la transmisión nerviosa, su proximidad a las regiones sinápticas parece implicarlos en la **modulación de la transmisión sináptica**, a pesar de ser células no excitables eléctricamente.

Existe un fenómeno de excitación astrocitaria asociado a variaciones de la concentración del Ca^{2+} intracelular. Estas variaciones pueden ser espontáneas, y proceder de reservorios intracelulares como el retículo endoplasmático, o ser inducidas por la propia activación neuronal (Santello et al. 2012). Las señales químicas presinápticas, como el glutamato, el GABA y el ATP entre otros, inducen un aumento de los niveles de Ca^{2+} en los astrocitos, los cuales en respuesta secretan glutamato, ATP o adenosina, que actúan directamente sobre las neuronas. Además de estas existen otras sustancias secretadas por los astrocitos capaces de mediar en la respuesta neuronal. Por ejemplo, la D-serina, es un modulador endógeno de los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), presente tanto en las células de Müller como en los astrocitos (Stevens et al. 2003). Todos estos compuestos que son capaces de modular la respuesta neuronal, se conocen con el nombre de **gliotransmisores** y son los responsables, junto con las señales neuronales, de regular tanto la respuesta de las neuronas presinápticas, como de inducir respuestas de activación o inhibición en las postsinápticas.

La participación de los astrocitos en la modulación de la transmisión de la señal nerviosa se conoce con el nombre de **sinapsis tripartita** (Newman 2003a, Pérez-Alvarez and Araque 2013) y se ha observado también a nivel de la retina (Newman and Zahs 1998, Newman 2004, Newman 2005).

1.3.2.1.2.6 Función neurotrófica

Bajo condiciones de estrés tisular, como sucede por ejemplo en los procesos isquémicos, los astrocitos suministran **factores tróficos** a las neuronas (Tokumine et al. 2003a, Tokumine et al. 2003b, Vivien and Ali 2006). Entre ellos destacan el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Condorelli et al. 1995, Friedman et al. 1996, Oderfeld-Nowak and Bacia 1994, Vargas et al. 2004), ciertas neurotrofinas (NTs), como la NT-3 y NT-4, y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en humanos (Jean et al. 2008, Moretto et al. 1994, Murer et al. 2001); estas células también secretan bFGF-2 (Riva and Mocchetti 1991), el factor de crecimiento ciliar (CNTF) (Leibinger et al. 2009, Müller et al. 2007, Richardson 1994), el factor de crecimiento de la insulina (IGF-1) (Gluckman et al. 1992, McMorris et al. 1993) y el TGF- α y β (Rabchevsky et al. 1998).

1.3.2.2 Células de Müller

1.3.2.2.1 Generalidades

En 1851 Heinrich Müller (1900-1945), capturó la primera imagen de lo que describió como “*fibras radiales*”, que más tarde pasarían a conocerse como células de Müller (Müller 1851). Estas células son un tipo de glía específica de la retina, siendo su población glial mayoritaria. Están dispuestas de manera radial ocupando todo el espesor y extensión retiniana, gracias a lo cual forman conexiones con todas las neuronas del tejido.

Las células de Müller, a pesar de presentar variaciones morfológicas debidas a la especie, presentan características universales. La morfología típica (Figura 1.5) responde a una célula bipolar, con dos prolongaciones principales que surgen desde su soma en sentidos opuestos (Ramón y Cajal 1892). Estas células se extienden desde la MLE hasta la MLI. El cuerpo celular se localiza en la CNI, conformado una subcapa dentro de ésta. En cuanto a sus prolongaciones, a nivel de la MLE, las células de Müller extienden unas microvellosidades apicales hacia el espacio subretiniano (ES) que se disponen entre los segmentos internos de los fotorreceptores. A este nivel, las células de Müller conectan con células de Müller vecinas y con los fotorreceptores, formando la MLE. De igual forma, a nivel de la CCG de la retina las prolongaciones celulares de las células de Müller experimentan una bifurcación y un engrosamiento característico, lo que se conoce morfológicamente como pies terminales (Reichenbach and Bringmann 2010a, Sarthy and Ripps 2001a). Éstos, al menos en parte, forman la MLI de la retina (Anezary et al. 2001, Ramírez et al. 1996).

Existen diferentes adaptaciones morfológicas de estas células a lo largo de la retina; así, cuanto más periférica es su localización, son más cortas y gruesas, siendo menor el número de prolongaciones que emiten, que a su vez son también más cortas y más gruesas. En las proximidades de la entrada del nervio óptico, la morfología celular se encuentra muy alterada, las células de Müller se modifican mostrando una apariencia más similar a la de los astrocitos protoplasmáticos (Reichenbach and Bringmann 2010a, Sarthy and Ripps 2001a).

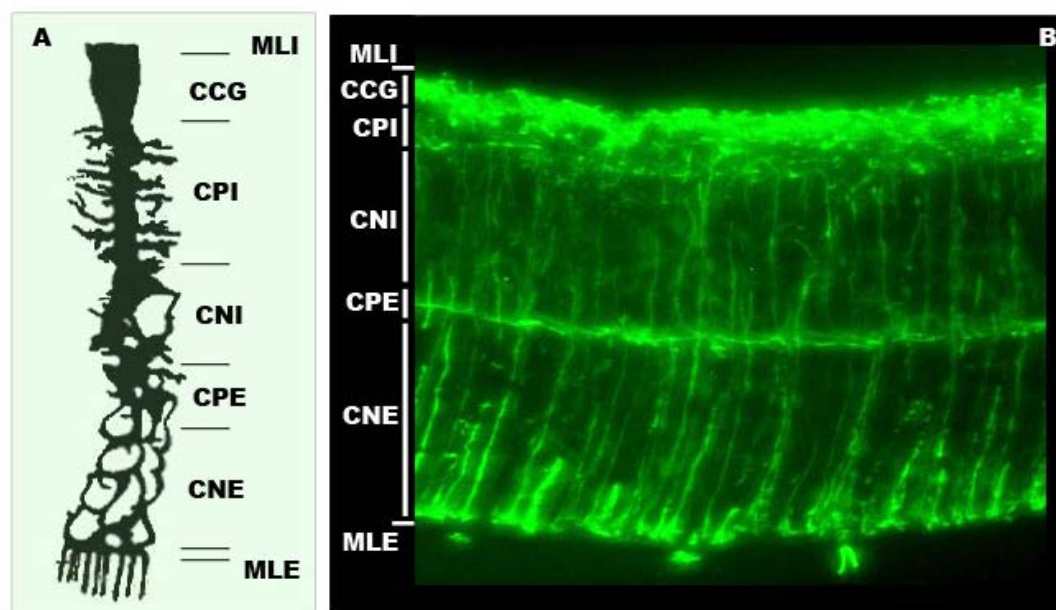


Figura 1.5. Células de Müller de la retina. A: Esquema de una célula de Müller. La glía de Müller de la retina es una célula radial que se caracteriza por tener dos prolongaciones principales que emergen en sentidos opuestos desde su soma, localizado en la CNI. **B: Sección histológica de una retina de rata. Inmunofluorescencia para vimentina (verde).** Las células de Müller forman una estructura columnar a lo largo de toda la extensión retiniana. [MLI: membrana limitante interna; CCG: capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; MLE: membrana limitante externa].

Las prolongaciones y el soma de las células de Müller, emiten ramificaciones que contactan con casi todos los elementos neuronales de la retina y con los vasos sanguíneos (Reichenbach and Bringmann 2010a). A nivel de las capas plexiformes de la retina se aprecian ramificaciones laterales de las células de Müller que forman una especie de vainas alrededor de las prolongaciones neuronales y de la región sináptica (Reichenbach et al. 1989). De manera similar, en las capas nucleares, estas prolongaciones lamelares de las células de Müller forman estructuras que envuelven a los cuerpos neuronales (Dreher et al. 1992, Hama et al. 1978, Reichenbach et al. 1988a, Reichenbach et al. 1989). En las retinas de los mamíferos, las células de Müller emiten unas prolongaciones finas hacia ciertas regiones de los axones de las CGRs, caracterizados por la presencia de una alta concentración de canales de Na^+ . Estas regiones se encuentran rodeadas por una corona formada por las prolongaciones de las células de Müller (y astrocitos en su caso) formando una estructura similar a la de los Nódulos de Ranvier. A estas prolongaciones se las denomina perinodales (Hildebrand and Waxman 1983, Hildebrand et al. 1993, Hollander et al. 1991, Reichenbach et al. 1988b).

Además de estas relaciones neuronales, las prolongaciones de las células de Müller rodean a los capilares sanguíneos, actuando como un sistema de comunicación metabólica entre los vasos y las neuronas. A pesar de ello, según algunos autores no está claro que estas células sean un componente esencial de la barrera hematorretiniana (*Sarthy and Ripps 2001a*), lo cual parece ser claro para otros (*Bringmann et al. 2006, Tout et al. 1993*).

Teniendo en cuenta la posición de las células de Müller a lo largo de todo el espesor retiniano, éstas se encuentran en condiciones de influir y ser influidas por la actividad neuronal. En este sentido, las células de Müller son las principales células gliales de apoyo a las neuronas en el adulto y llevan a cabo muchas de las funciones que los oligodendrocitos, los astrocitos y las células endoteliales desarrollan en otras regiones del sistema nervioso (*Bignami 1995, Bringmann et al. 2009b, Hollander et al. 1991, Newman and Reichenbach 1996, Reichenbach and Wohlrab 1986*). Además, las células de Müller también mantienen un vínculo funcional con regiones con las que mantienen un intercambio de moléculas, como es el caso de los vasos sanguíneos de la retina, el cuerpo vítreo, y el ES (*Bringmann et al. 2006*). Para ello, estas células poseen una gran cantidad de canales iónicos, receptores, transportadores moleculares transmembrana y enzimas (*Bringmann et al. 2006, Newman and Reichenbach 1996, Sarthy and Ripps 2001b*).

A diferencia de la susceptibilidad neuronal ante determinados procesos en el tejido, por el contrario, las células de Müller son sorprendentemente resistentes a situaciones isquémicas, a la hipoxia o a la hipoglucemia (*Silver et al. 1997, Stone et al. 1999*), siendo capaces de sobrevivir ante determinadas condiciones poco favorables. Una razón que justifica este hecho se deriva de la especialización de su metabolismo energético. Al igual que otros tipos de células gliales, se basa fundamentalmente en la glicólisis anaerobia. Su bajo consumo de oxígeno la hace resistente incluso a largos periodos de anoxia (*Bringmann et al. 2006, Poitry-Yamate et al. 1995, Winkler et al. 2000*). En las retinas avasculares, las células de Müller, contienen sólo unas cuantas mitocondrias en su extremo más distal como la única fuente de oxígeno (*Germer et al. 1998a, Germer et al. 1998b*). De hecho, el bloqueo energético mitocondrial prolongado en estos casos no induce cambios en funciones dependiente de energía, como es el mantenimiento del potencial de membrana (*Bringmann et al. 1999b*). Sin

embargo, en las retinas vascularizadas con presencia de un alto número de mitocondrias en las células de Müller (*Germer et al. 1998a*), cuando la energía mitocondrial producida por las mismas queda bloqueada, el potencial de membrana se despolariza lentamente sugiriendo que, a pesar de todo, estas células no son completamente resistentes a la ausencia de oxígeno. Las células de Müller también resisten a la falta de glucosa gracias a que otros sustratos, como el lactato, piruvato, glutamato o la glutamina, pueden ser metabolizados en el ciclo de Krebs (*Bringmann et al. 2006, Tsacopoulos et al. 1998, Winkler et al. 2000*).

1.3.2.2.2 Principales funciones de las células de Müller

Las funciones que se han atribuido clásicamente a las células de Müller son las de soporte, aislamiento y nutrición neuronal, lo que se pone de manifiesto en modelos en los que una destrucción selectiva de estas células es consecuente con una displasia retiniana, una apoptosis de los fotorreceptores y una degeneración retiniana final (*Dubois-Dauphin et al. 2000*).

1.3.2.2.2.1 Desarrollo embrionario de la retina

Las células de Müller inmaduras son importantes para la organización histotípica de la retina en desarrollo y la formación de las redes neuronales. Desde las etapas más incipientes del **desarrollo embrionario de la retina**, las células de Müller son esenciales para la formación y el mantenimiento de la arquitectura neuroretiniana. Estas células conforman una estructura de andamiajes que son el sustrato perfecto para la migración de las neuronas jóvenes (*Bringmann et al. 2006, Willbold et al. 1997*) y de sus neuritas en desarrollo (*Bringmann et al. 2006, Stier and Schlosshauer 1998*). En condiciones patológicas, las células de Müller parece que pueden recuperar esta capacidad y promover la migración neuronal en los procesos de remodelación tisular (*Sullivan et al. 2003*).

Posteriormente, durante las primeras semanas postnatales, cuando se establecen las conexiones sinápticas de las neuronas maduras de la retina, las células de Müller se someten a una serie de cambios asociados a funciones de apoyo neural. Entre ellos, la célula de Müller se modifica morfológicamente, extendiendo pequeñas prolongaciones

laterales entre los cuerpos de las neuronas y sus prolongaciones sinápticas (Bringmann et al. 2006, Reichenbach and Reichelt 1986). Además, también se observa entre estos cambios la acumulación de enzimas específicas como la glutamina sintetasa (Bringmann et al. 2006, Germer et al. 1997) y un cambio drástico en el patrón de expresión de ciertas proteínas de membrana (Bringmann et al. 1999a, Bringmann et al. 2006, Felmy et al. 2001, Pannicke et al. 2002).

Las células de Müller maduras en situaciones patológicas parecen tener la capacidad de diferenciarse a células progenitoras neuronales y por tanto participar en los procesos regenerativos del tejido (Fischer and Reh 2001).

1.3.2.2.2 Formación de la barrera hematorretiniana

Las células de Müller jóvenes están implicadas en el control de la vascularización retiniana (Bringmann et al. 2006, Wolburg et al. 1999); además, la estrecha relación espacial que mantienen las células de los vasos sanguíneos de la retina y las células de Müller, sugiere que éstas últimas tienen un papel clave de la **formación y mantenimiento de la barrera hematorretiniana** (Bringmann et al. 2006, Tout et al. 1993). En condiciones normales las células de Müller secretan el factor derivado del epitelio pigmentario de la retina (PEDF) (Eichler et al. 2004), que se encarga de neutralizar la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y por tanto de reducir la permeabilidad vascular. La expresión de PEDF en las células de Müller disminuye en condiciones de hipoxia y por lo tanto aumenta la permeabilidad vascular (Duh et al. 2002).

1.3.2.2.3 Regulación del metabolismo energético

En condiciones normales, las células de Müller están implicadas en el **metabolismo de la glucosa** en la retina, suministrando a las neuronas nutrientes para su metabolismo y eliminando los productos metabólicos de desecho (Bringmann et al. 2006, Poitry-Yamate et al. 1995, Tsacopoulos and Magistretti 1996).

El metabolismo glicolítico de las células gliales genera lactato, que a su vez se transforma en piruvato por mediación de ciertas enzimas gliales, como la lactato deshidrogenasa y la piruvato quinasa (Bringmann et al. 2006, Tsacopoulos et al. 1998). El piruvato

se libera al medio extracelular y es captado por las neuronas, que lo emplean como sustrato para su propio ciclo de Krebs (Bringmann et al. 2006, Poitry-Yamate et al. 1995). Esta interacción glía-neurona tiene consecuencias beneficiosas tanto para las neuronas, que están siendo alimentadas sin la necesidad de un costoso proceso glicolítico, como para las células gliales, que se deshacen de los desechos finales de su metabolismo.

1.3.2.2.4 **Mantenimiento de la homeostasis extracelular**

Las células de Müller también juegan un papel fundamental en la homeostasis del tejido nervioso (Bringmann et al. 2006, Newman and Reichenbach 1996).

Los cambios del pH extracelular pueden influir negativamente en la actividad y la sinapsis neuronal (Balestrino and Somjen 1988, Gottfried and Chesler 1994, Taira et al. 1993), al respecto, la glía de Müller participa activamente en el equilibrio iónico del tejido nervioso. Estas células son cruciales en **la homeostasis retiniana del K^+** (Bringmann et al. 2006, Newman and Reichenbach 1996, Newman et al. 1984, Reichenbach et al. 1992), ya que una concentración extracelular anómala de K^+ va a provocar una hiperexcitación neuronal y por tanto una toxicidad por glutamato (Bringmann et al. 2006, Newman 1989, Pannicke et al. 2000). Las membranas plasmáticas de las células de Müller son muy permeables al K^+ (Newman 1985) gracias a la presencia de canales de K^+ , como los canales de la familia Kir, particularmente los de tipo Kir4.1 y Kir2.1 (Bringmann et al. 2006, Kofuji et al. 2002), los canales TASK (Bringmann et al. 2006, Skatchkov et al. 2006) y los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Skatchkov et al. 2000). Gracias a todos ellos las células de Müller retiran el exceso de iones K^+ del medio extracelular hacia el vítreo, los vasos sanguíneos o el ES (Bringmann et al. 2006, Newman et al. 1984, Reichenbach et al. 1992).

Por otro lado, la actividad de las neuronas genera una alcalinización transitoria del medio extracelular (Borgula et al. 1989, Oakley and Wen 1989, Yamamoto et al. 1992), asociada a la **liberación de amoníaco** desde las mismas, a la activación de los receptores de los neurotransmisores o la captura de H^+ por las células de Müller durante el transporte del glutamato extracelular (Beart and O'Shea 2007, Coles et al. 1996, Owe et al. 2006). Sin embargo, estas variaciones del pH se equilibran gracias a una liberación de protones procedente de

los fotorreceptores (DeVries 2001) y por la acción de los transportadores ácido-base de las células de Müller.

En la retina se generan también **altas concentraciones de CO_2** . Las células de Müller, mediante la anhidrasa carbónica, transforman los productos de la oxidación de la glucosa, CO_2 y H_2O , en HCO_3^- y H^+ (Bringmann et al. 2006, Sarthy and Lam 1978). Sin embargo, estos productos también se deben eliminar ya que podrían revertir la reacción y generar nuevamente CO_2 . Para ello, las células de Müller están dotadas de un cotransportador de $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$, localizado preferentemente en sus pies terminales y un intercambiador de $\text{Na}^+\text{-H}^+$, mediante los cuales el ión HCO_3^- y los H^+ salen de la retina hacia el torrente sanguíneo y/o el vítreo (Newman 1996).

Las células de Müller están implicadas en la **homeostasis del agua** (Bringmann et al. 2004). En condiciones normales, el agua se acumula en la retina debido entre otras razones, a su entrada desde la sangre asociada a la captación de algunas sustancias metabólicas como la glucosa, también debido a la alta producción de agua metabólica en la síntesis oxidativa del ATP y finalmente debido a su entrada al ojo como consecuencia de la presión intraocular (PIO) (Bringmann et al. 2004, Marmor 1999). El transporte de agua retiniano hacia tejidos no neurales (vítreo, sangre y ES) se produce ligado a unas proteínas transportadoras de agua localizadas en las células de Müller, las acuoporinas. Se ha observado en estas células la coexpresión de acuoporinas de tipo 4 y de canales de potasio Kir4.1, lo que sugiere que el transporte de agua esté estrechamente ligado a corrientes de K^+ (Bringmann et al. 2006, Nagelhus et al. 1999).

Un aumento en el nivel de glutamato extracelular entre otros, puede contribuir a la disfunción y muerte neuronal (Barnett and Pow 2000, Bringmann et al. 2006); sin embargo, la glía de Müller juega un papel importante en el **mantenimiento de los niveles de los neurotransmisores**. Estas células tienen en sus membranas sistemas para la captación de aminoácidos excitatorios, entre ellos para el GABA (Biedermann et al. 2002, Bringmann et al. 2006, Qian et al. 1993, Sarthy 1982), la glicina (Bringmann et al. 2006, Gadea et al. 2002) y gracias al cotransportador GLAST también reciclan el glutamato extracelular (Brew and Attwell 1987,

Bringmann et al. 2006, Derouiche and Rauen 1995, Harada et al. 1998, Otori et al. 1994, Rauen et al. 1998, Sarthy et al. 2005). Posterior a su recaptación del medio extracelular, el glutamato se transforma en glutamina, por acción de la glutamina sintetasa, una enzima exclusiva de las células de Müller (*Bringmann et al. 2006, Linser and Moscona 1979*). Del mismo modo, el GABA se transforma en glutamato dentro de las células de Müller (*Biedermann et al. 2002, Bringmann et al. 2006*), y posteriormente en glutamina gracias a la glutamina sintetasa. Finalmente, la glutamina se transporta de vuelta a las neuronas como precursor del glutamato y del GABA (*Bringmann et al. 2006, Pow and Crook 1996*).

Las especies reactivas de oxígeno se generan en la retina como respuesta, entre otras a la anoxia y la isquemia. El glutatión es una de las sustancias más importantes para la protección retiniana contra estas especies y se ha visto cómo las células de Müller son capaces de sintetizarlo (*Huster et al. 2000, Pow and Crook 1996, Schutte and Werner 1998*), sugiriéndose la participación de estas células en la **regulación del daño oxidativo**. Sin embargo, la concentración de los niveles de glutatión disminuye de manera drástica por ejemplo en condiciones de hipoxia o hipoglucemia (*Huster et al. 2000*), lo que puede potenciar el daño oxidativo del tejido retiniano.

1.3.2.2.2.5 Transmisión de la señal nerviosa

Como consecuencia del reciclaje de los neurotransmisores, las células de Müller contribuyen a los procesos de señalización neuronal (*Bringmann et al. 2006, Matsui et al. 1999*). Además, estas células se caracterizan por generar, almacenar y liberar ciertas sustancias neuroactivas, como la D-serina, el ATP y el glutamato o sus precursores, que controlan la excitabilidad de las neuronas (*Bringmann et al. 2006, Newman and Zahs 1998, Newman 2003b, Stevens et al. 2003*) y por tanto la respuesta o actividad de las mismas.

Por otro lado, las células de Müller contribuyen de manera directa en la transmisión de la señal lumínica a través de la retina. Cuando la luz pasa a través de múltiples capas de células hasta alcanzar su destino final, como es el caso de la retina, las imágenes se deterioran rápidamente debido a fenómenos de dispersión en el tejido. Teniendo en cuenta esto, parece paradójico que la retina de los vertebrados sea de tipo invertido, lo

que significa que la luz debe atravesar varias capas celulares antes de llegar a las células fotorreceptoras (Hammer et al. 1995, Vos and Bouman 1964). Para paliar estos efectos, la retina ha desarrollado ciertas adaptaciones, entre ellas, está cubierta por un patrón regular de células que abarca todo su espesor: las células de Müller.

Las células de Müller conectan la superficie más interna de retina con la más externa. Los pies terminales de estas células cubren toda la superficie retiniana vítrea, por lo que cada fotón de luz que entra al ojo impacta automáticamente con al menos una de estas células. Franze et al. (Franze et al. 2007) observaron cómo las células de Müller eran capaces de transmitir la luz desde la superficie vítrea de la retina a los fotorreceptores con una baja dispersión a través de las diferentes capas retinas. Este hecho hizo postular que quizás las células de Müller podrían estar implicadas en una función guía en la **transmisión de la luz** hacia los fotorreceptores, de forma similar a como transfiere la señal una fibra óptica. La fibra óptica se caracteriza por tener un alto índice de refracción, al igual que las células de Müller, las cuales poseen valores mucho más altos que los otros tipos de células de la retina. Únicamente, los pies terminales de estas células tienen un índice de refracción más bajo, lo que permite una entrada muy eficiente de la luz desde el vítreo al interior de estas células. Una vez la luz entra en la glía de Müller, éstas podrían funcionar de forma similar a cómo lo hace la fibra óptica.

1.3.2.2.6 Función neurotrófica

Las células de Müller son capaces de secretar determinados factores neurotróficos y de crecimiento, los cuales promuevan la supervivencia de las neuronas ante determinadas condiciones patológicas. Tanto *in vivo* como *in vitro*, estas células gliales producen una amplia variedad de factores neuroprotectores, entre ellos el BDNF, CNTF, bFGF, el factor de crecimiento de la insulina (IGF-1), NGF, NT-3 y NT-4 (Avwenagha et al. 2006, Cao et al. 1997, Chakrabarti et al. 1990, Dicou et al. 1994, Gao and Hollyfield 1992, Garcia et al. 2003, Harada et al. 2000, Joly et al. 2007, Morimoto et al. 2005, Neophytou et al. 1997, Seki et al. 2005, Taylor et al. 2003, Walsh et al. 2001, Wilson et al. 2007). Por ejemplo, la expresión de CNTF y BDNF aumenta en respuesta a la excitotoxicidad retiniana (Honjo et al. 2000, Seki et al. 2005), lo que sugiere que la inducción de BDNF endógeno en las células de Müller podría tener un valor potencialmente

terapéutico ante determinados daños retinianos (Seki et al. 2005). Además, en respuesta a estímulos inflamatorios como la isquemia, las células de Müller producen TNF- α (Cotinet et al. 1997, de Kozak et al. 1994, Drescher and Whittum-Hudson 1996a, Drescher and Whittum-Hudson 1996b, Tezel and Wax 2000a), pudiendo éste presentar una acción dual, bien protectora (Diem et al. 2001) o tóxica (Tezel and Wax 2000a), para las neuronas de la retina.

1.3.2.3 Marcadores de la población macroglial: anticuerpos específicos

Existen múltiples anticuerpos para la detección de células macrogliales. Entre ellos cabe destacar los anticuerpos frente a proteínas del citoesqueleto celular. Dentro de éstos los más empleados son la GFAP, la proteína S-100 y la vimentina.

La **GFAP** es la constituyente principal de los filamentos intermedios (8-10 nm) de los astrocitos (Dahl and Bignami 1976, Lazarides 1980). Esta proteína está evolutivamente bastante bien conservada en los vertebrados (Dahl et al. 1985, Sassoe Pognetto et al. 1992), y su anticuerpo marca selectivamente las células astrogiales en distintas especies de mamíferos (Bignami et al. 1972, Ghandour et al. 1979). La GFAP se sobreexpresa ante el daño cerebral y otras patologías retinianas como el glaucoma o la retinopatía diabética (Eng et al. 2000, Kanamori et al. 2005, Kumar and Zhuo 2010, Pekny and Pekna 2004, Ramírez et al. 2010).

Otros estudios han localizado células GFAP+ dentro y fuera del sistema nervioso, como en las células de Schwann (Bianchini et al. 1992), los condrocitos (Hainfellner et al. 2001, Kepes et al. 1984), los fibroblastos (Hainfellner et al. 2001), las células mioepiteliales (Hainfellner et al. 2001, Viale et al. 1991), los linfocitos (Riol et al. 1997) y las células hepáticas estrelladas (Carotti et al. 2008). Generalmente las células de Müller de la retina expresan niveles bajos de GFAP (Bignami 1984, Jones and Schechter 1987, Linser et al. 1985, Semple-Rowland 1991, Torelli et al. 1989, Xue et al. 2006), sin embargo, en condiciones patológicas, como es el caso del glaucoma, las células de Müller cambian rápidamente la composición de su citoesqueleto incrementando la expresión de GFAP (Ramírez et al. 2010, Xue et al. 2006), siendo esto un indicador de reactivación glial (Bignami and Dahl 1979, Erickson et al. 1987, Lam et al. 2003, Lewis et al. 1995, Lewis and Fisher 2003, Tanihara et al. 1997, Wang et al. 2005c).

La **vimentina** es otra proteína constituyente de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular (Lazarides 1980). Se ha detectado esta proteína en las células endoteliales, las musculares, los fibroblastos, los macrófagos, los condrocitos, las células linfoides y en las células epiteliales (Dahl et al. 1981, Lazarides 1980). Respecto a las células gliales, los filamentos de vimentina coexisten con los filamentos de GFAP en los astrocitos del cerebro, la médula espinal, el nervio óptico y la retina (Calvo et al. 1990, Dahl 1981, Ono et al. 1999). Durante el desarrollo embrionario, los filamentos de los astrocitos son fundamentalmente de vimentina, sin embargo más adelante se produce una transición en la que éstos disminuyen a favor de un incremento de los filamentos de GFAP, siendo estos últimos los mayoritarios en el adulto (Bovolenta et al. 1984, Pixley and de Vellis 1984, Quitschke et al. 1985, Schnitzer 1988). Sin embargo, en situaciones patológicas del tejido nervioso, es característico observar un aumento en la expresión de la vimentina en los astrocitos maduros (Pekny and Pekna 2004). Las células de Müller en el desarrollo embrionario y en la retina adulta expresan vimentina como una de las proteínas fundamentales de sus filamentos intermedios (Perez-Alvarez et al. 2008). La vimentina se localiza en las prolongaciones de estas células, preferentemente en las que ocupan la región más interna de la retina (Nakazawa et al. 2007). Esto se correlaciona a la perfección con la disposición de los filamentos intermedios en estas células, que parecen disponerse dentro de la célula hasta nivel de la CPE (Reichenbach et al. 1988a, Reichenbach 1989).

La proteína **S-100 beta** pertenece a una familia de proteínas relacionadas con el calcio y están involucradas en la reorganización del citoesqueleto y la proliferación celular (Marenholz et al. 2004). Ésta se encuentra difusa por el citoplasma asociada a las membranas y a ciertos elementos del citoesqueleto. Se la ha localizado principalmente en los astrocitos y en las células de Müller de la retina (BenEzra and Chan 1987, Cocchia et al. 1983, Terenghi et al. 1983), aunque también está presente en las membranas y los núcleos neuronales, en las células de Schwann, en las células de la médula suprarrenal e incluso en algunas células de la hipófisis y células de Langerhans (Maddox et al. 1987, Mata et al. 1990, Terenghi et al. 1983). Los niveles de S-100 β aumentan en determinados procesos de reactividad astrocitaria asociados al envejecimiento y a varios trastornos cerebrales degenerativos, infecciosos o inflamatorios (Donato 2001, Heizmann et al. 2002, Mrak and Griffin 2004, Van Eldik and Wainwright 2003).

Además de estos anticuerpos contra proteínas del citoesqueleto, también se utilizan otros frente a neurotransmisores, como es el caso del **GABA** o frente a enzimas como la **glutamina sintetasa**, la **α -isoenzima enolasa**, la **monoamino oxidasa** o la **glucógeno fosforilasa** (Wiesinger et al. 1997).

1.3.3 Células microgliales

1.3.3.1 Generalidades

La microglía representa aproximadamente el 20% del total de la población de células gliales del SNC de los mamíferos (Banati and Graeber 1994, Barron 1995, del Río Hortega 1932, Kreutzberg 1995) siendo más abundante en la sustancia gris (del Río Hortega 1932, Kreutzberg 1995). Si se tiene en cuenta que la población glial es diez veces la población neuronal, probablemente existan tantas células microgliales como neuronas en el sistema nervioso (Streit 2013).

La microglía pertenece al linaje de los fagocitos mononucleares y es considerada la población inmune residente del sistema nervioso. La microglía puede realizar funciones propias de los fagocitos presentes en otros tejidos, tales como la fagocitosis, la inducción de la inflamación, y la presentación de antígenos (Aloisi 2001). El origen de la población microglial ha sido un tema muy controvertido, sin embargo la mayor parte de los neurobiólogos defienden, de acuerdo con del Río-Hortega, un origen hematopoyético, mesodérmico (Alliot et al. 1991, Chen et al. 2002, Eglitis and Mezey 1997). Al respecto, la microglía residente del sistema nervioso podría derivar bien de células primitivas hematopoyéticas o bien de monocitos que podrían haber abandonado el torrente sanguíneo. Estas células precursoras invadirían el parénquima del SNC en estadios tempranos del desarrollo embrionario, para posteriormente dar lugar a la microglía residente madura (Boya et al. 1979, Boya et al. 1987, Cuadros and Navascues 1998, Dalmau et al. 1998a, Ginhoux et al. 2010, Perry and Gordon 1991, Wu et al. 1992, Wu et al. 1993). También existen estudios que apuntan a que las células microgliales podrían proceder de pericitos vasculares migrados hacia el parénquima (Balabanov et al. 1999, Thomas 1992). Por otro lado aunque con menos éxito, existen otros estudios que promulgan que la microglía es una célula que podría tener un origen nervioso,

neuroectodérmico, donde los precursores de las neuronas y de otros tipos de células gliales podrían ser el origen de la población microglial (*Hao et al. 1991, Hutchins et al. 1990, Kitamura et al. 1984, Richardson et al. 1993*).

En condiciones normales, la microglía madura se caracteriza por ser una célula con un soma de tamaño pequeño y estar muy ramificada. Los **somas** pueden tener una forma triangular, redondeada, fusiforme u oval, entre otras; y de él emergen diversas prolongaciones en todas las direcciones. Estas **prolongaciones** tienen por norma una morfología conoidea, es decir, son más gruesas en las proximidades del cuerpo celular y se estrechan progresivamente a medida que se alejan de este para terminar en estructuras muy finas (*Gallego 1986*). Estas prolongaciones primarias, se dicotomizan dando lugar a otras ramas secundarias, y éstas a terciarias, de aspecto espinoso o veloso, lo que se debe a la presencia de numerosas estructuras espiculadas que emergen a su vez de ellas (*del Río Hortega 1919b*). Las células microgliales mayoritariamente suelen ser multipolares, sin embargo, existen otras de morfología monopolar y bipolar mucho menos frecuentes. Típicamente, las de aspecto bipolar, se localizan en regiones donde existen formaciones nerviosas de curso paralelo, como es el caso del estrato radiado del pie del hipocampo o en la CFN de la retina (*del Río Hortega 1919b*). Algo característico de la población microglial es que se distribuyen por el tejido nervioso uniformemente, de manera similar a cómo están dispuestas las teselas de un mosaico. A pesar de ello, la microglía dentro del tejido ocupa un espacio propio, sin realizar contacto normalmente con las microglías vecinas (*Graeber and Streit 2010, Jinno et al. 2007*).

A pesar de estas características generales, la microglía es una población celular de gran plasticidad morfológica. En condiciones normales estas pueden adaptar su protoplasma dependiendo de las estructuras anexas, lo que sugiere que es el medio lo que condiciona la apariencia celular. Sin embargo, la morfología de la microglía varía también en función del periodo de desarrollo celular en que se encuentren, del estado del sistema nervioso y asociado a ello de la función que desempeñen (*Thomas 1992*).

Ultraestructuralmente la microglía es una célula considerada de parénquima, ya que se encuentra por fuera de la membrana basal de los vasos. Sin embargo, estas células

pueden considerarse parte de la limitante glial perivascular, ya que el citoplasma de sus prolongaciones se encuentra entremezclado intermitentemente con los pies terminales de las prolongaciones de los astrocitos (Lassmann et al. 1991), debido a lo cual muchos trabajos han empleado el término **microglía perivascular** para referirse a la microglía del parénquima. Sin embargo, la microglía perivascular no debe confundirse con las células/macrófagos perivasculares, que a diferencia, no forman parte del parénquima del SNC dado que están separadas de él por la membrana basal perivascular (Guillemin and Brew 2004).

La microglía en la retina se distribuye por toda su extensión y se localizada en diferentes capas o estratos retinianos. Aunque su apariencia morfológica en las diferentes capas retinianas es heterogénea (Sobrado-Calvo et al. 2007), en general en las plexiformes aparecen unas células muy ramificadas, siendo éstas más compactas en las capas nucleares (Santos et al. 2008). Aunque la distribución de la microglía ha sido descrita en peces (Cuadros et al. 2006, Dowding et al. 1991, Salvador-Silva et al. 2000, Velasco et al. 1999), anfibios (Goodbrand and Gaze 1991), aves (Cuadros et al. 2006, Navascues et al. 1994, Won et al. 2000) y en mamíferos como el conejo (Ashwell 1989, Humphrey and Moore 1996, Schnitzer 1989), el ratón (Bosco et al. 2011, Santos et al. 2008, Santos et al. 2010, Zhang et al. 2005a), la rata (Ashwell et al. 1989, Harada et al. 2002, Zhang et al. 2005b), monos (Boycott and Hopkins 1981, Vrabec 1970) y humanos (Diaz-Araya et al. 1995, Gupta et al. 2003, Penfold et al. 1991, Provis et al. 1995, Yang et al. 2000), no existe un patrón único que defina su localización en el adulto. No obstante, en condiciones normales la microglía suele encontrarse en la retina más interna, con presencia en todas las capas de fibras (CFN, CPI y CPE) y en la CCG, estando está ausente por norma en la retina más externa (Lee et al. 2008, Santos et al. 2008, Santos et al. 2010). La presencia de células microgliales en la CNi es escasa en el ratón (Bosco et al. 2011) y en otras especies aparece exclusivamente en la etapa embrionaria, como ocurre en la codorniz (Marin-Teva et al. 1998, Marin-Teva et al. 1999a, Marin-Teva et al. 1999b, Marin-Teva et al. 1999c, Navascues et al. 1994, Navascues et al. 1995). También de manera excepcional, se han observado células de tipo microglía/macrófago en el ES de algunas especies de marsupiales (Herman and Steinberg 1982), en peces teleósteos (Allen and Hallows 1997, Braekevelt 1985, Lillo et al. 2001) y en anfibios (Eckmiller and Steinberg 1981). En los murinos también es poco frecuente observar células en esta región, aunque este hecho

parece ser dependiente de la pigmentación del animal. Al respecto, Ng et al. (Ng and Streilein 2001) detectaron células en el ES de ratones albinos pero no en las cepas pigmentadas.

1.3.3.2 Tipos morfológicos de la población microglial y funciones asociadas

1.3.3.2.1 Periodo embrionario: microglía ameboide

Durante el desarrollo embrionario y las etapas más tempranas postnatales, aparece un tipo microglial muy abundante conocido como **microglía ameboide** (Ling and Wong 1993). Morfológicamente son unas células redondeadas y pueden presentar unas prolongaciones cortas y gruesas.

Las primeras semanas de vida de los roedores, se caracterizan por la gran cantidad de muerte celular dentro del sistema nervioso (Perry et al. 1985). De manera similar a los macrófagos, la microglía ameboide contiene en su citoplasma numerosos lisosomas (Ashwell 1990, Ashwell 1991, del Río Hortega 1932, Wu et al. 1994) y posee capacidad migratoria (Rieske et al. 1989) y de adhesión (Giulian and Baker 1986, Suzumura et al. 1987), por lo que parece que esta célula estaría participando en la retirada de restos celulares (Ashwell 1990, Ashwell 1991, Boya et al. 1987, Cuadros and Navascues 1998) y de axones transitorios o aberrantes durante el desarrollo del tejido nervioso (Ashwell 1990). Por tanto, la microglía ameboide parece jugar un papel esencial durante el desarrollo del sistema nervioso participando en muchos de los procesos de **morfogénesis e histogénesis**, a fin de establecer la red de conexiones nerviosas del sistema nervioso maduro (Davis et al. 1994, Hanisch 2002, Streit 2002, Streit et al. 2005, van Rossum and Hanisch 2004).

Además de esto, la microglía ameboide también puede desempeñar un papel más activo durante el desarrollo del sistema nervioso. Por ejemplo, median en la muerte de algunas células (Cuadros and Navascues 1998), entre ellas las células endoteliales durante la regresión de los vasos sanguíneos transitorios en el ojo de los roedores (Lang et al. 1994, Marin-Teva et al. 2004, Thery et al. 1991). También están involucradas en el aumento de la complejidad del SNC pudiendo influir en el desarrollo y la función normal de las células gliales y de las neuronas mediante la producción de factores tróficos (Elkabes et al. 1996, Jonakait et al. 1996, Mazzoni and Kenigsberg 1997, Nagata et al. 1993), promoviendo la migración, el crecimiento

axonal y la diferenciación de muchos tipos de neuronas (Polazzi and Contestabile 2002). Son capaces de estimular la mitosis astrocitaria, estando implicadas en la **gliogénesis** (Perry and Gordon 1988, Schnitzer 1989, Thomas 1992). y parecen promover la **vascularización** del sistema nervioso (Giulian et al. 1988, Hamilton and Rome 1994).

Durante el desarrollo embrionario y hasta el momento de maduración de la barrera hematoencefálica, la microglía ameboide podría actuar como línea defensiva, encargándose de la fagocitosis de sustancias extrañas que atraviesan una barrera hasta el momento inmadura (Xu and Ling 1994a, Xu and Ling 1994b). La maduración de la barrera, podría ser un factor que determinase la transformación de esta microglía ameboide en una microglía madura ramificada (Wu et al. 1993, Xu et al. 1993).

1.3.3.2.2 Periodo postnatal: estado maduro

Cuando el desarrollo embrionario entra en su fase perinatal, la microglía ameboide sufre una serie de diferenciaciones alcanzando en este momento su **forma madura** (Streit 2013). La microglía ameboide desaparece del sistema nervioso adulto en favor de la presencia de una microglía de aspecto ramificado (Barron 1995, Ling and Wong 1993).

La microglía del tejido nervioso maduro se vuelve menos activa que la célula embrionaria (Cuadros and Navascues 1998), lo que se refleja en que las células microgliales adultas y las ameboides embrionarias responden de manera diferente a estímulos similares (Lawson and Perry 1995, Milligan et al. 1991). La mayoría de las funciones como fagocitos de estas células, entre ellas la fagocitosis, la inducción de inflamación o la habilidad de actuar como células presentadoras del antígeno (CPAs), están disminuidas, lo que hace que la célula se comporte más como una propia célula glial que como un macrófago. Sin embargo, cabe destacar que durante el curso de diversas alteraciones del sistema nervioso, la microglía exagera múltiples funciones efectoras macrofágicas así como la expresión de determinadas moléculas que la permiten mediar en el proceso de muerte o reparación celular (Vilhardt 2005).

Los estudios clásicos han sugerido que la microglía dentro del parénquima nervioso se puede encontrar al menos en tres estadios morfológicos diferentes, estando cada uno

de ellos ligados a ciertas características funcionales. La microglía puede encontrarse en un **estado de reposo o quiescente**, un **estado reactivo** y por último otro en el que la célula se encuentra activa y además presenta **capacidad fagocítica** (Hanisch and Kettenmann 2007, Kettenmann et al. 2011, Streit 2013); siendo éstos total o parcialmente reversibles. Sin embargo, recientemente han sido propuestos otros estadios microgliales, entre ellos la microglía hiperramificada o la microglía distrófica que también veremos.

1.3.3.2.1 Microglía quiescente

En condiciones normales, la microglía se encuentra en un estado de reposo, **microglía quiescente** (Figura 1.6). Esta terminología puede resultar confusa ya que la célula microglial en reposo se encuentra lejos de ser una célula pasiva dentro del SNC. Morfológicamente, se caracteriza por poseer un cuerpo celular pequeño del que emergen varias prolongaciones profusamente ramificadas, lo que dota a la célula de una gran capacidad *sensora* en el tejido nervioso. La microglía se distribuye por todo el tejido nervioso, de tal manera que es capaz de detectar de manera precoz cambios bioquímicos y bioeléctricos en el curso de cualquier proceso patológico (Kreutzberg 1996).

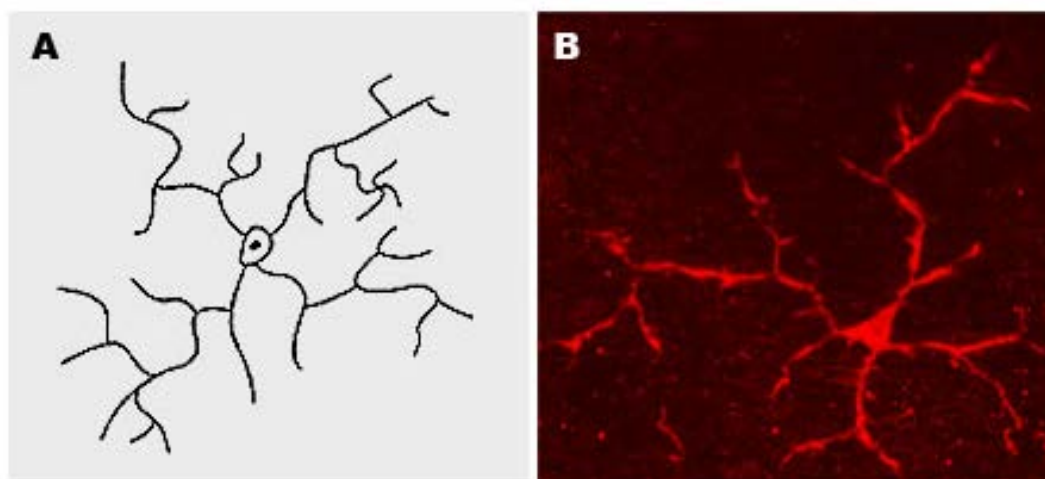


Figura 1.6. Microglía en estado quiescente. A: dibujo de una microglía ramificada. [Modificada de Streit 2013]. **B: imagen de una microglía ramificada. Inmunofluorescencia Iba-1.** Esta célula morfológicamente se caracteriza por poseer un cuerpo celular pequeño del que emergen varias prolongaciones profusamente ramificadas.

El estado quiescente de esta célula, o al menos en parte, se debe a la presencia del receptor CD200R en la microglía (Kitamura 1973, Wright et al. 2003), y a la interacción de éste

con su ligando CD200, una glicoproteína transmembranosa localizada en las neuronas (Gorczynski et al. 2004, Hoek et al. 2000, Vieites et al. 2003, Webb and Barclay 1984, Wright et al. 2003). Otra quimiocina relacionada con el control de la activación microglial es la fractalquina (CX3CL1) secretada por las neuronas, la cual interacciona con su receptor CX3CR1 presente en las células microgliales (Streit 2013).

En condiciones normales, es probable que la microglía madura realice funciones que garanticen la **homeostasis de tejido nervioso**. Estas células *in vitro* parecen llevar a cabo procesos de endocitosis (Glenn et al. 1991, Pow et al. 1989, Ward et al. 1991) por lo que se les atribuyen funciones de **limpieza y detoxificación** del medio extracelular (Castellano et al. 1990, Castellano et al. 1991, Navascues et al. 1994, Ward et al. 1991), de forma similar a los macrófagos. Además secretan bajos niveles de moléculas biológicas activas, tales como factores neurotróficos o citoquinas antiinflamatorias como el BDNF, NT-4/5 y quizás pequeñas concentraciones de NT-3 y NGF (Nakajima and Kohsaka 2005). Pero no sólo eso, la microglía también protege **contra el daño oxidativo** ya que posee un sistema muy eficiente para el transporte de la cisteína, necesaria para la síntesis del glutatión intracelular y por ello para la protección contra las especies reactivas de oxígeno (Rimaniol et al. 2000).

Se ha postulado que las células de microglía intervienen de alguna manera en la **transmisión sináptica**, ya que presentan en su membrana la 5' nucleotidasa (Kreutzberg et al. 1978, Kreutzberg and Barron 1978, Sjostrand 1966), la adenosina 5' trifosfatasa (ATPasa) (Ibrahim et al. 1974) y la purino-nucleósido fosforilasa (PNPasa) (Castellano et al. 1990), enzimas que intervienen como neurotransmisores o neuromoduladores en el cerebro. En condiciones normales existen unas células microgliales, conocidas como **microglías satélites perineuronales**, que se localizan cerca de las neuronas. Éstas realizan contactos directos célula-célula envolviendo con sus prolongaciones al soma neuronal (Palacios 1990). Esta interacción celular entre ambas poblaciones podría contribuir a **la remodelación de la sinapsis neuronal**. La microglía puede responder perfectamente a esta función ya que secreta enzimas, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs), moléculas de la matriz extracelular (MEC), tales como la laminina y el queratán sulfato, y factores neurotróficos.

La microglía quiescente de manera constitutiva expresa en su superficie canales iónicos, moléculas de reconocimiento inmunológico y receptores de neurotransmisores, lo cual podría estar implicado en el mantenimiento de un estado inmunológico latente de la microglía en condiciones normales. Sin embargo, tras un daño en el tejido nervioso, el patrón de expresión de moléculas de superficie cambia, lo cual es necesario para regular los procesos inflamatorios y de reparación tisular (Streit 2013).

1.3.3.2.2 Microglía hiperramificada

Además de los clásicos estadios funcionales en los que se ha clasificado a la microglía, recientemente ha sido descrito un nuevo estadio celular intermedio entre la microglía quiescente y la activada conocido como **microglía hiperramificada** (Figura 1.7). Este estado parece ser el comienzo de una hipertrofia microglial, una característica consistente con la reactivación microglial *in vivo* (Streit et al. 1999).

Se ha documentado que el estrés crónico puede inducir un estadio de hiperramificación microglial, caracterizado por un incremento de la complejidad de las ramificaciones secundarias microgliales, que no de las primarias, (Beynon and Walker 2012, Hinwood et al. 2013) sin modificar el área que ocupa la célula (Hinwood et al. 2013). Parece que esta microglía hiperramificada tiene la habilidad de reorientar sus prolongaciones, y gracias a ello, realizar más contactos con las terminaciones sinápticas (Fontainhas et al. 2011, Hinwood et al. 2013, Tremblay et al. 2010).

Algunos autores no han encontrado evidencias sobre esta hiperramificación celular en respuesta al daño (Stence et al. 2001); sin embargo, otros la han podido observar tanto en presencia de diferentes señales de estrés no patológicas para el tejido nervioso (Fontainhas et al. 2011, Hinwood et al. 2013, Sugama et al. 2007, Tremblay et al. 2010, Tynan et al. 2010), como en el curso de procesos degenerativos cerebrales asociados al daño axonal (Hurley and Coleman 2003, Morrison and Filosa 2013, Wilson and Molliver 1994).

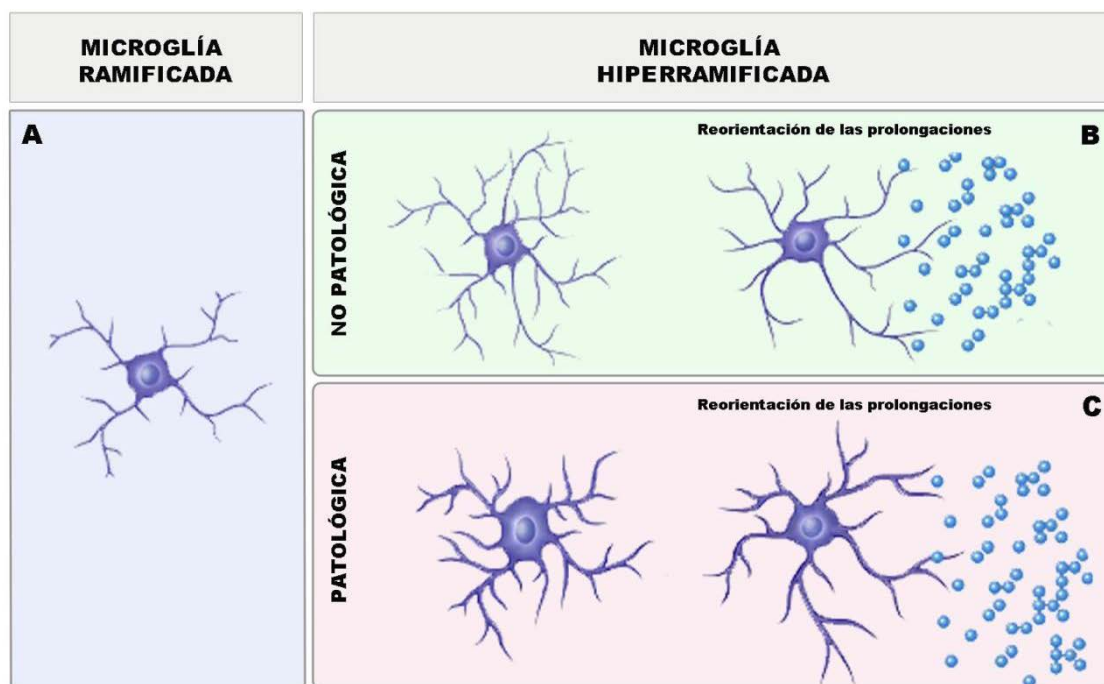


Figura 1.7. Remodelación morfológica de la microglía en respuesta a la señal patológica y no patológica. A: microglía ramificada adulta en condiciones normales. Esta célula presenta típicamente un soma redondeado u ovoide del que emergen unas prolongaciones primarias profusamente ramificadas. **B y C: microglía hiperramificada adulta. B:** alteraciones morfológicas microgliales en respuesta a señales de estrés en el medio no patológicas. **C:** alteraciones morfológicas microgliales en respuesta a una lesión o a una señal relacionada con la inflamación. La hiperramificación representa un estadio intermedio entre el estado quiescente y reactivo de la microglía. Las células hiperramificadas se caracterizan por el incremento de la complejidad de sus prolongaciones y por la reorientación de éstas hacia el lugar de la lesión. [Modificada de Beynon and Walker 2012].

1.3.3.2.2.3 Microglía reactiva

Cuando el tejido nervioso se encuentra comprometido, la microglía adquiere un fenotipo que se conoce como reactivo. Esta **microglía reactiva** (Figura 1.8) sufre **cambios morfológicos** (Beynon and Walker 2012, Stence et al. 2001), entre los que se observa un aumento del tamaño del soma, un engrosamiento y retracción de sus prolongaciones celulares y una disminución del número de las ramificaciones más distales. Estas transformaciones parecen estar asociadas a ciertas sustancias presentes en el medio como factores de crecimiento, aminoácidos, citoquinas, como el TGF- β , el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Schilling et al. 2001), la fibronectina, la laminina y otros factores no solubles (Tanaka et al. 1999).

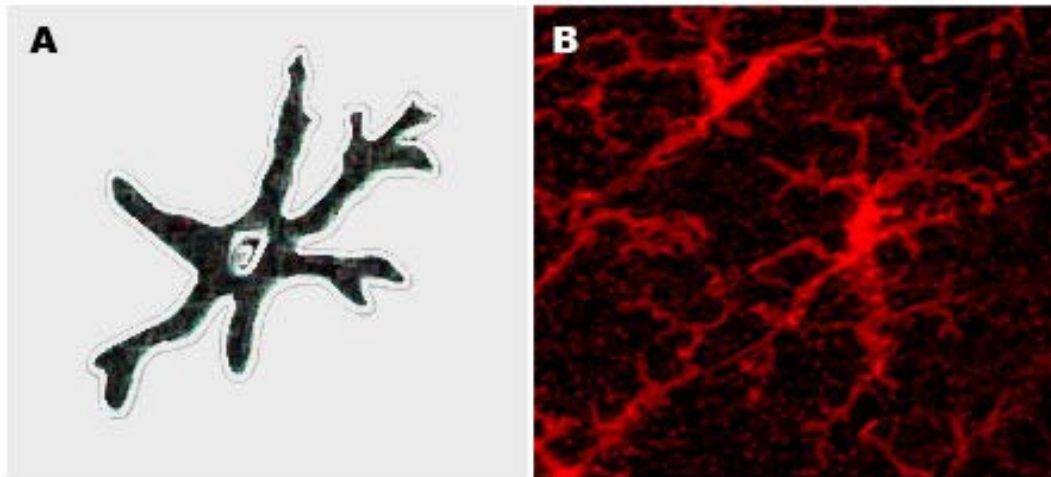


Figura 1.8. Microglía en estado reactivo. A: dibujo de una microglía ramificada reactiva. [Modificada de Streit 2013]. **B: imagen de una microglía ramificada reactiva. Inmunofluorescencia Iba-1.** La microglía en estado reactivo sufre cambios morfológicos, entre ellos se observa un aumento del tamaño del soma y una retracción de sus prolongaciones celulares.

El estado reactivo de la microglía también se caracteriza por presentar fenómenos de **proliferación celular**, asociados posiblemente a la presencia de M-CSF y de GM-CSF, ambos secretados por los astrocitos reactivos, o a ciertas interleucinas (IL) como la IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 y el TNF- α (Aloisi 2005, Giulian and Ingeman 1988).

En este estado también se producen **procesos migratorios** microgliales, permitiéndolas desplazarse hacia la región lesionada, interactuar y/o eliminar las neuronas muertas o dañadas del tejido (Joly et al. 2009, Karlstetter et al. 2010, Langmann 2007, Santos et al. 2010).

Además de todo lo anterior, la microglía reactiva sufre **modificaciones inmunofenotípicas**. En ellas se observa la expresión *de novo* de ciertos **receptores de superficie** y la sobreexpresión de otros presentes en condiciones normales relacionados con el sistema inmune, entre ellos receptores de quimioquinas y citoquinas, receptores del complemento y receptores de reconocimiento de patrones (Aloisi 2005). Estas células son también responsable de la síntesis de **sustancias mediadoras en las respuestas inflamatorias** tanto de tipo innato como adquirido (Aloisi 2005). Entre éstas podemos encontrar citoquinas antiinflamatorias, TGF- β , IL-10, y otras sustancias como proteasas, prostaglandinas, radicales libres de oxígeno y nitrógeno y moléculas proinflamatorias

como, IL-1 β , IL-12, TNF- α (Aloisi 2005, Nakajima and Kohsaka 2005). En condiciones normales, la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en el parénquima nervioso, necesarias para la presentación de los antígenos a las células T, es mínima o está ausente y, cuando está presente, se localiza en alguna microglia (Gehrmann et al. 1995, Hayes et al. 1987), indicando que la microglía quiescente se comporta de manera muy pobre como una CPA (Ford et al. 1995). Sin embargo, ante prácticamente todos los procesos neuroinflamatorios o neurodegenerativos, la microglía reactiva incrementa la expresión de MHC-II y por tanto su capacidad para comportarse como una **CPA** (Kreutzberg 1996) y participar en los procesos inflamatorios.

Entre otras funciones, la microglía activada, *in vivo* e *in vitro*, expresa **transportadores de glutamato** (Kondo et al. 1995, Persson et al. 2005). Aunque el reciclaje de este neurotransmisor extracelular es llevado a cabo principalmente por los astrocitos, la microglía posee un 10% de participación en este proceso (Leonova et al. 2001) en condiciones normales. Sin embargo, durante los procesos patológicos, esta pequeña participación de la microglía podría ser un mecanismo de rescate ante un fallo en la recaptación por parte de la astrogliia.

Todas las modificaciones que sufre la microglía reactiva van a diferir entre los distintos procesos patológicos y la severidad de los mismos. Inicialmente, la reactivación microglial está implicada en la reparación del tejido nervioso (Chen et al. 2002, Streit 2002) asociada a la secreción de ciertas citoquinas y sustancias neuroprotectoras (Nakajima and Kohsaka 2005), jugando por tanto un papel beneficioso dentro del tejido nervioso. Estudios *in vivo*, han puesto de manifiesto que el daño neuronal asociado a un proceso patológico se recupera en presencia de esta microglía activa. Sin embargo, en procesos agudos, la microglía se puede transformar en una célula agresora (Streit 2002). Este hecho podría ser perjudicial para el sistema nervioso; sin embargo, se ha correlacionado con procesos de eutanasia celular, también conocidos como neurotoxicidad facilitaria. Mediante estos procesos las neuronas comprometidas son eliminadas del medio para evitar que el daño se propagase a otras regiones ilesas dentro del sistema nervioso, jugando por tanto estas microglías un papel neuroprotector. Por el contrario, una reactivación anormal de la

microglía en el curso de una patología, mayoritariamente en las de tipo crónico, podrá exacerbar el daño neuronal, asociado a la presencia de ciertas sustancias neurotóxicas, y presentar por tanto un papel nocivo para el sistema nervioso (de Kozak et al. 1997).

1.3.3.2.4 Microglía fagocítica

Cuando el sistema nervioso sufre un daño severo que cursa con la degeneración y/o muerte neuronal, tanto en procesos agudos como en alteraciones neurodegenerativas (Alzheimer y esclerosis múltiple), la microglía puede alcanzar un **estado reactivo fagocítico** (Figura 1.9) (Minagar et al. 2002, Nakajima and Kohsaka 2005, Thanos and Richter 1993, Thanos et al. 1992, Thanos 1993), jugando un papel importante en el reconocimiento y la eliminación de las neuronas deterioradas (Thanos 1992, Thanos and Richter 1993, Thanos 1991, Thanos et al. 1992).

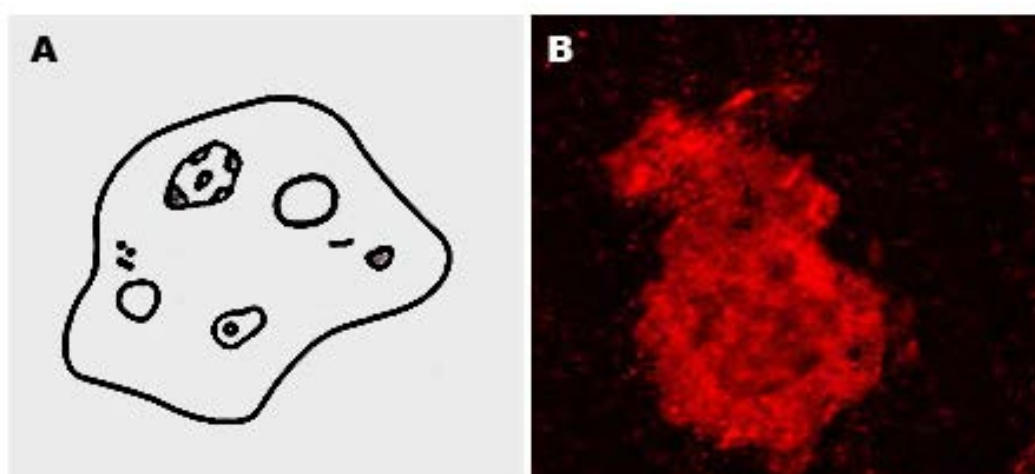


Figura 1.9. Microglía en estado fagocítico. A: dibujo de una microglía fagocítica. [Modificada de Streit 2013]. **B: imagen de una microglía fagocítica. Inmunofluorescencia Iba-1.** La microglía en estado fagocítico sufre cambios morfológicos severos y se caracteriza por tener un soma redondeado y una gran retracción o ausencia de sus prolongaciones.

En esta etapa las células presentan **cambios morfológicos** severos, caracterizándose por tener un soma redondeado y una gran retracción o ausencia de sus prolongaciones (Beynon and Walker 2012, Eyo and Dailey 2013, Franciosi et al. 2012, Madore et al. 2013, Stence et al. 2001), A estas células se las conoce como microglías ameboides, ya que se asemejan ultraestructuralmente a las células microgliales embrionarias (Jordan and Thomas 1988, Murabe and Sano 1981, Ziebell et al. 2012), y están asociadas a un perfil proinflamatorio (Walker et al. 2014).

Estas células microgliales no sólo se asemejan morfológicamente a los macrófagos, también comparten con ellos su capacidad de proliferación, de movilidad dentro del tejido y la sobreexpresión de ciertos marcadores, entre ellos el MHC-II y el CD68 (Walker et al. 2014). Al respecto, durante la inflamación esta microglía puede adquirir propiedades de células dendríticas, y por tanto ser capaces de presentar antígenos de forma profesional a las células T y por tanto mediar en los posibles fenómenos inflamatorios asociados. No debe pasarse por alto que los macrófagos, la microglía y las células dendríticas tienen precursores mieloides comunes, lo cual puede inducir a error al no poder identificar y diferenciar, en muchos casos de manera definitiva, un tipo celular de otro (McMahon et al. 2006).

Esta microglía ameboidea podría originarse, a partir de la microglía residente del parénquima tras sufrir una serie de transformaciones morfológicas severas (Bosco et al. 2011, Chiu et al. 2009, Ebert et al. 2009, Garcia-Valenzuela et al. 2005, Joly et al. 2009, Karlstetter et al. 2010, Lewis et al. 2005, Sasahara et al. 2008) o bien, haberse diferenciado de monocitos/macrófagos, infiltrados desde el torrente sanguíneo (Nakajima and Kohsaka 2005) por un fallo de las barreras hematoneurales, como se observa en diversas patologías retinianas, entre ellas el glaucoma (Garcia-Valenzuela et al. 2005, Howell et al. 2012, Joly et al. 2009, Langmann 2007, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009, Zhang and Tso 2003).

1.3.3.2.2.5 Microglía distrófica

También se ha reconocido otro tipo morfológico/funcional microglial denominado **microglía distrófica** (Figura 1.10) (Streit et al. 2004). Los rasgos morfológicos más característicos de estas microglías son la fragmentación, parcial o completa, del citoplasma celular, cierta condensación del núcleo que posiblemente esté reflejando picnosis nuclear, y la pérdida o alteración de las prolongaciones celulares. Entre ellas, pueden observarse prolongaciones citoplásmicas fragmentadas, retorcidas, de curso tortuoso y cortas, siendo frecuente observar en ellas estructuras en forma de cuentas o esferoides. Todos estos cambios podrían estar presagiando la futura muerte programada microglial (Streit et al. 2004).

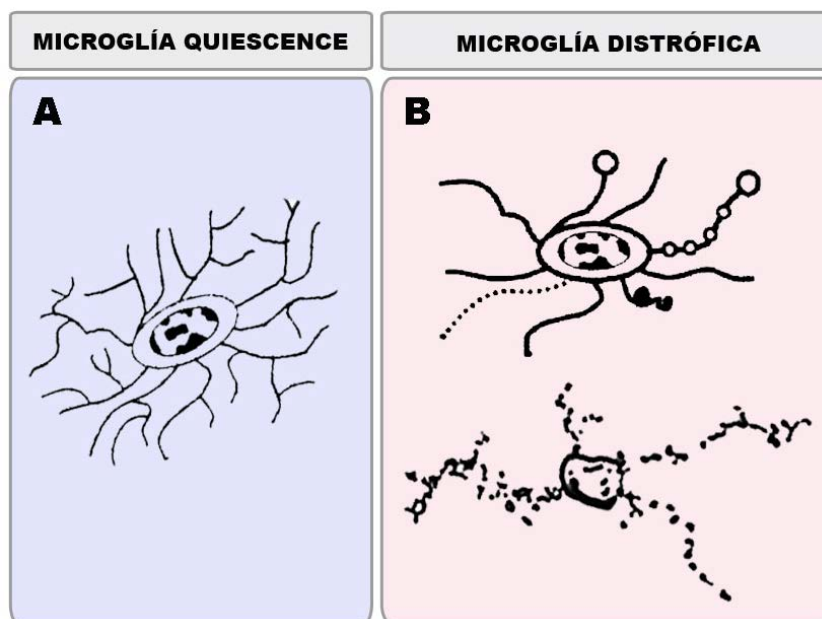


Figura 1.10. Modificaciones morfológicas de la microglía en respuesta a la edad y a su sobreactivación en neurodegeneraciones crónicas. Microglía distrófica. A: dibujo de una microglía ramificada en estado quiescente. **B:** dibujos de microglías ramificadas distróficas. La microglía distrófica se caracteriza por la fragmentación del citoplasma celular, la condensación del núcleo y la pérdida o alteración de las prolongaciones celulares, entre ellas la fragmentación, la tortuosidad, el acortamiento y la aparición de estructuras en forma de cuentas o esferoides. [Modificadas de Streit et al. 2004 y de Streit 2013].

Aunque esta microglía parece estar especialmente relacionada con el envejecimiento, sin embargo, una sobreactivación microglial crónica en el curso de diferentes patologías podría conducir a su degeneración, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer y en el síndrome de Down (*Graeber and Streit 2010*). Actualmente, hay estudios *in vitro* que apoyan la idea de que una reactivación desmesurada de la microglía conduce a la muerte celular (*Liu et al. 2001, Polazzi and Contestabile 2006*).

Existe hoy en día una gran controversia en torno a la reactivación microglial y su posible papel neurotóxico. Si se considera que la sobrereactivación microglial puede ser potencialmente dañina para las neuronas, la presencia de la microglía distrófica, una célula abocada a morir, podría ser una estrategia fisiológica neuroprotectora. Biológicamente esto cobra sentido, sobre todo si se tiene en cuenta, que a diferencia de la mayoría de las otras células en el SNC, la microglía puede ser sustituida y por ello puede ser relativamente prescindible en algunos momentos donde su función esté comprometida. Pero por otro lado, si este tipo de muerte celular ocasiona una pérdida crítica de microglías, las neuronas

perderán todo el apoyo microglial y estarán abocadas a un neurodegeneración final (Graeber and Streit 2010).

1.3.3.3 Marcadores de la población microglial

Desde que del Río-Hortega en 1918 desarrollase el carbonato de plata amoniacal como el primer marcador selectivo para la población microglial, se han sucedido una infinidad de nuevos marcadores. Sin embargo, uno de los problemas principales que aún persiste hoy en día, se encuentra en la dificultad de diferenciar correctamente la microglía activada de los macrófagos que infiltran el tejido nervioso en condiciones patológicas, ya que muchos de los marcadores empleados identifican proteínas de membrana presentes en ambas poblaciones celulares.

1.3.3.3.1 Técnicas histoquímicas enzimáticas

Las técnicas histoquímicas enzimáticas más específicas para la detección de microglía en estado quiescente son la **tiamina pirofosfatasa (TPPasa)** (Schnitzer 1989, Terubayashi et al. 1984), la **purino-nucleósido fosforilasa (PNPasa)** (Castellano et al. 1990) y la **nucleósido difosfatasa (NDPasa)** (Schnitzer 1989, Schnitzer and Scherer 1990). Por otro lado, la microglía activada o fagocítica tanto *in vitro* como *in vivo*, muestran una mayor actividad para ciertas enzimas que no se encuentran en la microglía quiescente, entre otras la **fosfatasa ácida, la 5'-nucleotidasa y la oxidoreductasa**. Otros estudios han puesto de manifiesta la presencia de la **óxido nítrico sintasa (NOS)**, la **ciclooxigenasa (COX)**, **proteasas lisosomales, activador tisular del plasminógeno, lisozima, purino-nucleósido fosforilasa (PNPasa)** y la **elastasa** (Banati et al. 1993, Castellano et al. 1990, Nakajima et al. 1992, Walsh et al. 2000).

Estas técnicas sólo se pueden emplear en secciones realizadas con vibratomo, debido a causas de sensibilidad enzimática. Además, estas actividades enzimáticas no son selectivas para la identificación de la población microglial, ya que aparecen en otras estructuras, entre ellas los vasos sanguíneos y otras células gliales (Dalmau et al. 1998b, Ibrahim et al. 1974, Martinez-Murillo et al. 1979).

1.3.3.3.2 Técnicas histoquímicas con lectinas

Las lectinas son proteínas que se unen a los azúcares de las membranas de una infinidad de células, pero en el parénquima nervioso parecen hacerlo específicamente a la microglía. Varios estudios han observado la presencia de una amplia variedad de residuos azucarados en la membrana de la microglía. Entre los más destacados está la galactosa, reconocida gracias a la isolectina B4 de la "*Griffonia simplicifolia*" (Boya et al. 1991a, Boya et al. 1991b, Ma and Streilein 1998) o a la lectina de ricino "*Ricinus communis*" (Boya et al. 1991a, Streit 1990), y la poli-N-acetil lactosamina lectina, revelada por la "*Lycopersicon esculentum*" o lectina de tomate (Acarin et al. 1994).

1.3.3.3.3 Técnicas inmunohistoquímicas

La membrana plasmática microglial posee un amplio repertorio de antígenos de superficie, lo que ha potenciado el desarrollo de multitud de anticuerpos, contribuyendo a una mejor caracterización de estas células.

Curiosamente, muchos de los anticuerpos no han sido diseñados específicamente para la microglía, sino para células del sistema inmune. Entre ellos, marcadores específicos de los macrófagos del ratón, como el **F4/80** (Hume et al. 1983, Perry et al. 1985) y anticuerpos frente a receptores del complemento, como el **Mac-1** y el **OX42** en la rata y el ratón respectivamente, que reconocen el antígeno CD11b/CD18, también conocido como receptor del complemento tipo 3 (CR3) (Graeber et al. 1988). Es interesante destacar que todos estos antígenos también se encuentran en los macrófagos fuera del tejido neural, lo que manifiesta por un lado el potencial fagocítico que posee la población microglial, y por otro la estrecha relación de éstas con las células de estirpe mieloide-monocítica.

Actualmente no existe un anticuerpo exclusivo de microglía, es decir, uno que no reaccione de manera cruzada con otros macrófagos. Todos los anticuerpos que marcan la microglía quiescente, también marcan la activada y los macrófagos periféricos (Streit 2013). Este hecho complica la diferenciación de estas dos poblaciones celulares, siendo su apariencia morfológica y la expresión de **CD45** entre otros, algunos rasgos distintivos entre ellas. El CD45 es un antígeno presente en las membranas citoplasmáticas de todas las

células del linaje de los monocitos/macrófagos. Mientras que los macrófagos parecen presentar un intenso marcaje CD45+, la microglía madura del parénquima lo hace ligeramente, incrementándose no obstante en situaciones de daño nervioso (*Herber et al. 2006, Santos et al. 2010*). No obstante, los trabajos de Bertolotto et al. en cerebro de rata (*Bertolotto et al. 1993, Bertolotto et al. 1995, Bertolotto et al. 1998*) y de Ng et al. en la retina del ratón (*Ng and Streilein 2001*) observaron cómo un anticuerpo dirigido contra el queratán sulfato, **5D4**, marcaba específicamente la microglía ramificada y no los macrófagos periféricos ni la microglía ameboide.

En la actualidad, está muy extendida la utilización del anticuerpo **Iba-1** (*ionized calcium-binding adapter molecule*), también conocido como **AIF-1** (*allograft inflammatory factor-1*). Este detecta *in vivo* e *in vitro*, tanto en el cerebro como en la retina, una proteína de membrana en las células del linaje de los monocitos/macrófagos, por lo que marca las células dendríticas, los macrófagos y la microglía, pero no las neuronas, los astrocitos ni la oligodendroglía (*Fu et al. 2011, Imai et al. 1996, Ito et al. 1998, Kaneko et al. 2008, Liu et al. 2007, Naskar et al. 2002, Ohsawa et al. 2000, Schallner et al. 2012*). Esta proteína colocaliza con los filamentos de actina y está implicada en ciertos cambios de la membrana citoplasmática, conocidos como *membrane ruffling*, durante los procesos de fagocitosis y movilidad de estas células (*Imai and Kohsaka 2002, Ito et al. 1998, Ohsawa et al. 2000, Sasaki et al. 2001*). En el cerebro, la expresión de Iba-1 aumenta notablemente en la microglía reactiva en condiciones patológicas (*Ito et al. 1998, Ito et al. 2001, Mori et al. 2000, Sasaki et al. 2001*), y de igual manera ocurre ante diferentes patologías retinianas, como es el caso del glaucoma (*Bosco et al. 2008, Inman and Horner 2007, Naskar et al. 2002*).

Existen ciertos anticuerpos muy empleados para el reconocimiento de la microglía reactiva, entre ellos el ED-1 (CD68), el SRA (CD204) y anticuerpos contra el MHC-II (*Graeber and Streit 2010*).

El anticuerpo **ED-1** reconoce al antígeno CD68 en la rata, conocido como macrosialin en el ratón, que es una glicoproteína de membrana de los lisosomas y de la membrana plasmática de células con capacidad fagocítica activa (*da Silva and Gordon 1999, Kullberg et al. 2001, Kurushima et al. 2000, Milligan et al. 1991*). Por tanto, este anticuerpo marca exclusivamente

la microglía que se ha reactivado y que está realizando funciones fagocíticas. De manera muy incipiente tras el daño, la expresión de ED-1 aumenta considerablemente, y vuelve a valores normales nuevamente cuando la muerte neuronal culmina (*Santos et al. 2010*).

El **SRA** (CD204), reconoce receptores scavengers de clase A en las células dendríticas y en las células fagocíticas (*Yamada et al. 1998*). En condiciones normales, este antígeno se encuentra exclusivamente en los macrófagos perivasculares (*Mato et al. 1996*), y aparece en la microglía del parénquima en condiciones de estrés y daño neuronal (*Bell et al. 1994, Herber et al. 2006*). La expresión del SRA en la microglía, al igual que la del ED-1, es transitoria (*Santos et al. 2010*) y está considerada un marcador de activación microglial (*Alarcon et al. 2005, Bell et al. 1994, Herber et al. 2006, Husemann et al. 2002*).

La membrana citoplasmática de la microglía contiene moléculas comunes con los leucocitos, entre otras las moléculas del **MHC-II**, ante las cuales se han desarrollado anticuerpos como el **OX6** o el **OX3** (anti-MHC-II y anti-Lewis MHC-II respectivamente). En condiciones normales la expresión de estas moléculas en el cerebro y en la retina es muy baja, siendo la microglía la principal célula que expresa este tipo de antígenos (*Gehrmann et al. 1995, Graeber and Streit 2010, Hayes et al. 1987, Streit et al. 1989*). Sin embargo, bajo prácticamente todas las condiciones inflamatorias y neurodegenerativas, la expresión del MHC-II aumenta de forma considerable en la microglía tanto activada como fagocítica (*Graeber and Streit 2010, Kreutzberg 1996, Streit and Sparks 1997*).

1.3.4 Las células gliales en los procesos patológicos: activación glial

En presencia de señales de estrés que puedan comprometer la supervivencia neuronal, las células gliales se reactivan, lo que se conoce con el nombre de **gliosis**. El objetivo básico de una gliosis aguda no es otro sino el de proteger el tejido nervioso, sin embargo, una respuesta descontrolada, como ocurre en la mayoría de las patologías neurodegenerativas, entre ellas el glaucoma, tendrá consecuencias negativas para el tejido, asociado al incremento de sustancias neurotóxicas en el medio, como son el óxido nítrico (ON), las especies reactivas de oxígeno o el TNF- α (*Giulian et al. 1994b*).

La activación de las células gliales puede estar mediada no sólo por señales activadoras (*ON*), sino también por la ausencia de señales inhibitoras (*OFF*) que controlan el estado quiescente de la glía. Esta vía de señalización *ON/OFF* puede producirse tanto por relaciones físicas entre neurona-glía o glía-glía, como por señales químicas asociadas a factores solubles liberados desde las neuronas y desde las propias células gliales. Dentro de los factores solubles responsables de las **señales de activación** se encuentran ciertas quimiocinas como la CCL21 y la CXCL10, diferentes neurotransmisores como el glutamato (Biber et al. 2007) y moléculas poco frecuentes en el medio en estado fisiológico, como los complejos antígeno-anticuerpo o moléculas opsonizadas. Las **señales de inhibición** pueden estar mediadas por contactos intercelulares neurona-glía, como es el caso de la relación entre CD200-CD200R (Hoek et al. 2000, Neumann 2001), CX3CL1-CX3CLR1 o SIRP α -CD47 (Hanisch and Kettenmann 2007, Liu et al. 2006, Verge et al. 2004) y por factores solubles, como neurotransmisores o neuropéptidos liberados por las neuronas, citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, el TGF- β y diversos glucocorticoides procedentes de la glía (John et al. 2003).

Aunque los procesos glióticos de los diferentes tipos de células gliales son heterogéneos entre sí, sin embargo existen características universales que se repiten como son los **cambios morfológicos**, la **proliferación celular**, la **fagocitosis** y la producción de **factores pro- y antiinflamatorios** o de factores de crecimiento (Kettenmann and Verkhratsky 2008).

1.3.4.1 Cambios morfológicos de las células gliales

Acabamos de ver cómo la microglía sufre una serie de cambios morfológicos tras su reactivación que han permitido establecer los diferentes estadios celulares descritos previamente: microglía quiescente, microglía hiperramificada, microglía reactiva, microglía fagocítica y microglía distrófica (Walker et al. 2014).

Sin embargo, el resto de las estirpes gliales también van a sufrir estos cambios. Los astrocitos, aunque de manera menos marcada que la microglía, sufren cambios morfológicos asociados a alteraciones del SNC. La astrogliosis se caracteriza por un

incremento de los filamentos intermedios del citoesqueleto de estas células, incluyendo la GFAP, la vimentina e incluso la nestina, lo que se acompaña por una hipertrofia celular. Inicialmente, estos cambios ayudan a mantener la integridad estructural del tejido, rellenando los huecos que dejan las neuronas al morir y restaurando los defectos de las barreras hematonerviosas (*Lewis and Fisher 2003, Liedtke et al. 1996, Pekny and Nilsson 2005, Vazquez-Chona et al. 2011*). No obstante y de manera adversa, los procesos de cicatrización que impiden la regeneración axonal llevan asociados un incremento de la GFAP (*Menet et al. 2001, Rudge and Silver 1990, Vazquez-Chona et al. 2011*), hecho que ha sido correlacionado con una disfunción metabólica y una alteración electrofisiológica de las neuronas (*DiLoreto et al. 1995a, DiLoreto et al. 1995b, Marc et al. 1998, Marc et al. 2008, Vazquez-Chona et al. 2011*).

Asimismo, la gliosis de las células de Müller se correlaciona con una hipertrofia celular, caracterizada por un ensanchamiento tanto de sus somas como de sus prolongaciones. Bajo microscopía electrónica se ha observado cómo las prolongaciones más finas de la célula se retraen, o incluso desaparecen, y que los pies terminales son más amplios y densos. Al igual que ocurría en los astrocitos, estos cambios morfológicos de las células de Müller se asocian a cambios en sus filamentos intermedios; por un lado, incrementan considerablemente la expresión de las proteínas fundamentales del citoesqueleto de estas células, como la vimentina, y por otro aumentan otras proteínas, que en condiciones normales o no existen o están en concentraciones muy pobres, como es el caso de la GFAP (*Sarthy and Ripps 2001c*). Estos cambios pueden finalmente llevar asociados la formación de cicatrices gliales impidiendo la reparación y remodelación del tejido y contribuyendo a la degeneración neuronal (*Bringmann et al. 2004, Bringmann et al. 2006, Bringmann et al. 2009a*).

1.3.4.2 Proliferación de las células gliales

Existen dos posibles formas de gliosis, una proliferativa y otra no proliferativa. Diversos trabajos han determinado que serán los cambios que se generan durante el curso de las diferentes patologías lo que determine el tipo de gliosis.

No se conoce completamente ni los mecanismos mitogénicos que promueven la proliferación glial, ni tampoco las posibles señales que la inhiben en condiciones normales. No obstante, ciertas sustancias, entre ellas factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores y ciertos cationes, como el Ca^{2+} y el K^+ han sido relacionados con la proliferación glial.

La microglía parece proliferar en presencia de ciertas citoquinas, como el M-CSF, GM-CSF (Giulian and Ingeman 1988), la IL-1 β , IL-6 o el TNF- α (Allan and Rothwell 2001, Bajetto et al. 2002, Ganter et al. 1992, Hanisch 2002, Kloss et al. 1997), y de ciertos factores de crecimiento, entre ellos el bFGF (Lewis et al. 1992), el BDNF y la NT-3 (Elkabes et al. 1996).

La proliferación de los astrocitos se asocia frecuentemente a la presencia de citoquinas como el IFN- γ , TNF- α , M-CSF, la IL-1, IL-2 y la IL-6 (Balasingam et al. 1994, Balasingam et al. 1996, Barna et al. 1990, Cardenas and Bolin 2003, Giulian and Baker 1985, Giulian et al. 1986, Herber et al. 2006, Herx and Yong 2001, Klagsbrun and D'Amore 1991, Mohri et al. 2006, Pennell and Streit 1997, Selmaj et al. 1991, Sievers et al. 1993, Smith and Hale 1997, Zhang et al. 2009). También quimioquinas, como la CXCL10 y la CCL5 (Bajetto et al. 2002), y prostaglandinas, entre ellas la prostaglandinas E_2 (PGE2) (Zhang et al. 2009), promueven la proliferación astrogliar. Por otro lado se ha visto que algunos factores de crecimiento están involucrados en este proceso, cabe destacar entre ellos el TGF- β y NGF, que mediarán en la formación de cicatrices gliales (Escartin and Bonvento 2008), el bFGF (Lewis et al. 1992), el factor derivado de plaquetas (PDGF) (Polikov et al. 2010) y la endotelina 1 (ET-1) (Prasanna et al. 2005).

Han sido reconocidos muchos factores de crecimiento y citoquinas que inducen la proliferación de las células de Müller, es el caso del bFGF (Lewis et al. 1992, Puro and Mano 1991), NGF (Ikeda and Puro 1994), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Roque et al. 1992, Scherer and Schnitzer 1994), el factor derivado de plaquetas (PDGF) (Uchiyori and Puro 1991), la IL-1 y la IL-2 (Small et al. 1991). Además, otras moléculas como el glutamato (Sahel et al. 1990, Sahel et al. 1991) y algunos cationes, como Ca^{2+} (Puro and Mano 1991) y el K^+ (Puro et al. 1989, Reichelt et al. 1989), promueven la proliferación de estas células.

1.3.4.3 Producción de factores pro- y antiinflamatorios por las células gliales

Las células gliales reactivas producen una ingente cantidad de factores neurotróficos, como ya hemos visto, y sustancias pro- y antiinflamatorias, tales como las citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, el ON y las especies reactivas de oxígeno, que mediarán en la muerte o supervivencia neuronal.

Entre los **mediadores proinflamatorios** más importantes secretados por las células gliales en el curso de alteraciones del SNC podemos encontrar el TNF- α , la IL-1 y la IL-6.

Tanto la microglía (Meda et al. 1995) como los astrocitos (Brenner et al. 1993, Lieberman et al. 1989) son capaces de secretar **TNF- α** , que promueve el reclutamiento de monocitos al tejido nervioso (Gosselin and Rivest 2007). En presencia del TNF- α , ambas poblaciones gliales aumentan su capacidad fagocítica, la expresión de moléculas del MHC-II, la proliferación celular y la producción de ON (Xiao and Link 1998).

La **IL-1** es una citoquina proinflamatoria liberada en el curso de diversos procesos patológicos (Griffin 2006) por la microglía, pero no por los astrocitos (Herx et al. 2000, Herx and Yong 2001). Esta proteína fomenta la secreción de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- α (John et al. 2005) y es responsable de la reactivación astrocitaria (Giulian et al. 1988, Giulian et al. 1994a, Giulian et al. 1994b) y consecuentemente con el aumento de ON y especies reactivas de oxígeno (Thornton et al. 2006). La IL-1, induce la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas en las células endoteliales de los vasos y en los astrocitos, potenciando la extravasación y el reclutamiento de leucocitos al SNC (Aloisi 2001).

Aunque los astrocitos son potentes secretores de **IL-6** (Van Wagoner and Benveniste 1999), la microglía es la principal fuente de esta citoquina (Frei et al. 1989) que puede tener tanto un perfil pro- como antiinflamatorio (Campbell 1998, Raivich et al. 1999). La microglía parece secretar IL-6, especialmente durante las primeras etapas tras el daño nervioso (Raivich et al. 1999), y secuencialmente actuar sobre los astrocitos, que participarán en los procesos de reparación tisular (Raivich et al. 1999). También se ha visto que la IL-6 es un mediador importante en la activación de la propia microglía (Raivich et al. 1996, Streit et al. 2000).

En un primer momento, la presencia de estas sustancias proinflamatorias será vital en la restauración de la homeostasis tisular y por tanto en la viabilidad neuronal. Sin embargo, si esta reacción se cronifica, podrá tener efectos adversos en el tejido. Para garantizar que esto no ocurra, existen una serie de mecanismos reguladores que controlan que la activación glial se produzca de manera controlada y tan sólo durante un periodo de tiempo limitado. Entre estos mecanismos se encuentra la secreción de ciertas **sustancias proinflamatorias**. Entre las más importantes cabe destacar la presencia en el medio de IL-10 y el TGF- β .

Tanto la microglía como los astrocitos parecen secretar **IL-10** (Aloisi 2001) detectándose también en ambas poblaciones el ARNm del receptor de esta proteína (Ledeboer et al. 2002, Mizuno et al. 1994). La IL-10 es un potente supresor de la activación de macrófagos/microglía gracias al control de la secreción de ciertas sustancias proinflamatorias como el TNF- α , IFN- γ , la IL-1, IL-6, IL-8, quimioquinas, radicales de nitrógenos y oxígeno y consecuentemente de la expresión de ciertas moléculas asociadas a la presentación del antígeno (Aloisi 2001, Heneka and O'Banion 2007, Moore et al. 2001, Strle et al. 2001). Además, la IL-10 también atenúa y modula la reactivación astrocitaria (Balasingam et al. 1996).

El **TGF- β** , al igual que la IL-10, es un potente supresor de la activación de macrófagos/microglía (Aloisi 2001) y un importante modulador de la respuesta inmune (Li et al. 2006) a través de la regulación de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células T (Li et al. 2006, Ludviksson and Gunnlaugsdottir 2003). Su expresión aumenta coincidiendo con la reactivación glial (Luo et al. 2007) siendo los astrocitos, las células de Müller y la microglía las principales fuentes de TGF- β 1 (Antonelli-Orlidge et al. 1989, Behzadian et al. 1995, Behzadian et al. 1998, Kiefer et al. 1993, Logan et al. 1994, Luo et al. 2007, McTigue et al. 2000, Sato and Rifkin 1989).

1.3.4.4 Fagocitosis y presentación del antígeno de las células gliales

El sistema nervioso ha sido considerado un lugar dotado con un privilegio inmune, sin embargo, hoy en día se sabe que existen respuestas inflamatorias dentro del SNC y que

éstas parecen jugar un papel importante en el curso de determinadas patologías (Hickey 1999).

La fagocitosis es uno de los eventos más precoces asociados al inicio de las respuestas inmunes, siendo responsable de la retirada de patógenos y restos celulares del medio. Las células que participan en estos procesos de la **inmunidad innata**, tienen unos receptores de membrana llamados *receptores de reconocimiento de patrones* (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) que se encargan de reconocer patrones moleculares presentes en la mayoría de los patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*). Estos receptores, entre ellos los de tipo Toll, (TLRs, del inglés *toll-like receptors*), están involucrados en activar una respuesta inflamatoria, e incluso algunos de ellos son además receptores fagocíticos, que son responsables de la reorganización del citoesqueleto celular imprescindible durante el proceso de fagocitosis (Underhill and Ozinsky 2002).

Las células microgliales son las principales efectoras de fagocitosis en el sistema nervioso. Durante el desarrollo embrionario presentan una importante labor fagocítica transitoria con el fin de eliminar las células neuronales apoptóticas (Ferrer et al. 1990). En su etapa madura, la microglía expresa una amplia variedad de marcadores específicos de los macrófagos, como los receptores de tipo Toll (Bsibsi et al. 2002, Lehnardt 2010, Olson and Miller 2004), la integrina CD11b/CD18 (también conocida como CR3) (Akiyama and McGeer 1990) y la glicoproteína F4/80, sin embargo su baja expresión hace que la capacidad fagocítica de la microglía sea reducida en condiciones normales. No obstante, en el curso de ciertos procesos patológicos, aumenta en estas células la expresión del receptor del complemento tipo 1, 3 y 4 (CR1, CR3 y CR4) (Barnum 1999), y de los TLRs (Gandhi et al. 2010, Lehnardt 2010, Owens 2009), asociado a un incremento de su capacidad fagocítica.

Los astrocitos son células fagocíticas menos eficientes que la microglía, participando sólo en aquellos casos en los que la microglía esté realizando funciones fagocíticas al límite de sus posibilidades (Magnus et al. 2002). Estas células presentan diversos receptores de tipo Toll, como los TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9 (Bowman et al. 2003, Bsibsi et al. 2002), receptores de manosa o receptores scavengers. En condiciones normales, la expresión de todos ellos

es baja; sin embargo, incrementan su expresión rápidamente en respuesta a estímulos proinflamatorios (Bsibsi et al. 2007, Luo et al. 2010a).

La glía de Müller en condiciones normales expresa receptores de tipo Toll, lo que la otorga un papel clave dentro de la inmunidad innata. En la retina del ratón, estas células expresan TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, y TLR9; mientras que *in vitro* expresan todos los receptores de tipo Toll conocidos para el humano (TLR1-TLR10). Estos receptores aumentan su expresión en situaciones anómalas (Kumar and Shamsuddin 2012), siendo capaces de fagocitar fragmentos de neuronas muertas, células del EPR, proteínas extravasadas, hemoglobina y otros cuerpos extraños exógenos, como partículas de cobre o bolas de látex (Buchi 1992, Chang et al. 2006, Crafoord et al. 2000, Egensperger et al. 1996, Ehrenberg et al. 1984, Francke et al. 2001, Garcia and Vecino 2003, Inomata 1975, Mano and Puro 1990, Nishizono et al. 1993, Rosenthal and Appleton 1975, Stolzenburg et al. 1992, Thanos 1999).

Además de esta respuesta de la inmunidad innata, la activación de las células gliales, también puede poner en marcha otras respuestas mediadas por los linfocitos T y B, y por tanto asociadas a una **inmunidad de tipo adaptativo o adquirido**.

En las respuestas de tipo adquirido, los encargados de reconocer y eliminar los elementos nocivos del tejido serán los linfocitos T activados, sin embargo no son capaces de hacerlo de manera directa. Los linfocitos T expresan en su superficie lo que se conoce como receptores de células T (TCR, del inglés T cell receptors), mediante los cuales sí pueden reconocer fragmentos de los antígenos, siempre y cuando éstos estén unidos a las CPAs. Por tanto, las CPAs tendrán que reconocer los patógenos, procesarlos y finalmente presentárselos a los linfocitos T con la ayuda de una proteína de membrana denominada **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)**.

Existen dos tipos de CPAs, las “profesionales” y las “no profesionales”. Son CPAs profesionales las células dendríticas, los monocitos/macrófagos, los linfocitos B maduros y las células del endotelio vascular. Éstas internalizan los antígenos exógenos vía endocitosis y/o fagocitosis y se caracterizan por presentar en su superficie de forma constitutiva moléculas del MHC-II, siendo por tanto células muy eficaces en la puesta en marcha de una reacción inmune mediada por linfocitos T. Sin embargo, las CPAs “no profesionales” son

células que aunque en condiciones fisiológicas expresan niveles muy bajos o inexistentes de moléculas del MHC-II, y por tanto su capacidad de actuar como CPAs sea limitada, estas moléculas pueden inducirse en presencia de ciertas señales proinflamatorias. Este último es el caso de las células gliales. En condiciones normales sólo la microglía tiene una pequeña expresión de moléculas de MHC-II, lo que no se observa ni en los astrocitos ni en las células de Müller (Aloisi 2001, Zhang et al. 1997). No obstante, bajo condiciones inflamatorias severas, ante un incremento del estrés oxidativo y de mediadores proinflamatorios, como el TNF- α o el IFN- γ , las células gliales pueden aumentar la expresión de las moléculas del MHC-II y por tanto su capacidad para actuar como CPAs eficientes (Aloisi et al. 2000a, Aloisi 2001) pudiendo estar implicadas en la puesta en marcha de procesos inflamatorios de tipo adaptativo.

1.4 Neurodegeneración óptica glaucomatosa

1.4.1 Concepto y factores de riesgo

La definición actual de glaucoma dista de lo que Goldmann en 1954 reconociera como la esencia de esta patología, la hipertensión ocular (HTO). Desde entonces, el término de glaucoma se ha empleado mayoritariamente para designar aumentos de la PIO; sin embargo, en 1996 la American Academy of Ophthalmology (AAO) definió el glaucoma como una neuropatía óptica crónica, multifactorial, caracterizada por la pérdida progresiva de los axones de las CGRs. Esta pérdida axonal se correlaciona con un menor espesor de la CFN de la retina y produce en la cabeza del nervio óptico, un aumento de la excavación y un adelgazamiento del anillo neurorretiniano. Funcionalmente, estos cambios histológicos se traducen en una pérdida de campo visual (Sociedad Europea de Glaucoma 2008, Weinreb and Khaw 2004).

Existe un amplio abanico de factores que pueden ser responsables del comienzo del daño glaucomatoso, y por tanto el término de neuropatía óptica glaucomatosa engloba todas aquellas patologías capaces de producir degeneración y muerte de las CGRs asociadas a la pérdida progresiva de campo visual (Villegas and Vidal 2002).

La neuropatía óptica glaucomatosa se ha asociado frecuentemente con **valores de PIO elevados**; sin embargo, éste no es sino uno de los factores de riesgo más prevalentes, siendo además el único ante el cual se puede actuar (Alward 2000). Además de estos glaucomas asociados a valores de PIO elevados, denominados glaucomas primarios de ángulo abierto, otros pueden desarrollarse ante valores de PIO normales, los denominados glaucomas normotensivos. La **edad** (Figura 1.11) es otro de los factores más importantes en el desarrollo de la patología glaucomatosa, aumentando su incidencia exponencialmente a partir de los 60-65 años (de Voogd et al. 2005, Kanski 2004). La **raza** es otro factor que predispone a la patología; el riesgo de padecer glaucoma primario de ángulo abierto es mayor en sujetos negros y su debut puede comenzar a edades más tempranas (Tielsch et al. 1991). Los sujetos de origen asiático, europeos y norteamericanos sin embargo presentan mayor asociación a glaucomas normotensivos. En cuanto al **género** los resultados son muy heterogéneos entre los diferentes trabajos, sin embargo globalmente la enfermedad parece afectar más a las mujeres que a los hombres (Quigley and Broman 2006). Otros factores que se han asociado a esta patología son la miopía, los antecedentes familiares, las alteraciones tiroideas, el síndrome de la apnea del sueño y la hipertensión arterial entre otros (Boland and Quigley 2007).

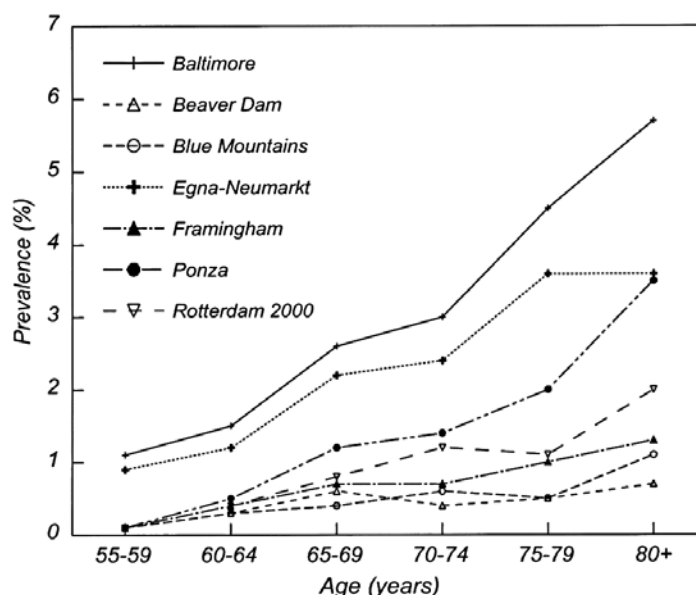


Figura 1.11. Prevalencia del glaucoma primario de ángulo abierto según diferentes estudios. [Modificada de Wolfs et al. 2000].

La situación sanitaria del glaucoma presenta una perspectiva preocupante, ya que es la segunda causa de ceguera irreversible en el primer mundo (*Quigley and Broman 2006*) por detrás de la degeneración macular asociada a la edad. La mayoría de las formas de la patología son asintomáticas hasta la afectación del campo visual central y se presenta como un fenómeno crónico y progresivo (*Naskar et al. 2002*). Por todo ello, el diagnóstico precoz y la neuroprotección representan los principales retos terapéuticos de esta patología y se fundamentan en el mantenimiento de la funcionalidad celular.

1.4.2 Fisiopatología de la neurodegeneración óptica glaucomatosa

A pesar de que la patología glaucomatosa tiene una etiología multifactorial, el incremento de la PIO y/o la desregulación vascular parecen ser los factores principales que darán lugar a los daños iniciales en esta patología (*Gallego et al. 2013*).

En el glaucoma, aproximadamente la mitad de las CGRs se pierden en las primeras fases de la patología (*Mittag et al. 2000, WoldeMussie et al. 2001*) y esta muerte parece estar mediada principalmente por un proceso apoptótico (*Agar et al. 2000, WoldeMussie et al. 2001*) tanto en el humano (*Kerrigan et al. 1997, Wax et al. 1998a*) como en modelos animales (*García-Valenzuela et al. 1995, Li et al. 1999*). La vía de las caspasas ha sido propuesta como la principal ruta de muerte en las CGRs, existiendo valores elevados de las caspasas 3, 8 y 9 en las CGRs tras un incremento de la PIO (*Hanninen et al. 2002, McKinnon et al. 2002*).

La muerte de las CGRs en el glaucoma parece producirse, a grandes rasgos, en dos etapas fundamentales; durante la primera de ellas, la población muere directamente por el impacto que tiene el factor desencadenante, como pueda ser la PIO, sobre las propias células (*WoldeMussie et al. 2001*); posteriormente, a esta muerte inicial se le une una segunda fase de pérdida neuronal más lenta, que parece estar mediada por la toxicidad que inducen en el tejido las células muertas o dañadas (*Levkovitch-Verbin et al. 2002b*).

Durante las primeras fases del glaucoma, aparecen alteraciones muy incipientes que van a participar en la evolución del daño glaucomatoso. Entre ellas cabe destacar la obstrucción del transporte axoplásmico, modificaciones de los componentes de la MEC, la reactivación de las células gliales y la presencia de respuestas anómalas del sistema

inmune. Aunque se desconoce la causa exacta por la que se produce la muerte de CGRs, estas alteraciones iniciales parecen estar en relación con eventos como la neurotoxicidad mediada por un exceso de glutamato extracelular, radicales libres y de otras sustancias como el ON, la privación de NTs y el fallo energético mitocondrial. Todos estos factores se encuentran relacionados entre sí y participan en la muerte de las CGRs como una entidad única (Agarwal et al. 2009, Osborne 2008, Wax and Tezel 2002).

1.4.2.1 Mecanismos primarios implicados en la patología glaucomatosa

1.4.2.1.1 Células ganglionares de la retina en respuesta a la presión intraocular

La PIO ha sido considerada uno de los factores de mayor peso en la pérdida de CGRs en el curso de la neurodegeneración glaucomatosa; siendo numerosos los autores que han puesto de manifiesto la estrecha relación entre el aumento de la PIO y la muerte de las CGRs (Chauhan et al. 2002, Levkovitch-Verbin et al. 2002b, Morrison et al. 1997, Quigley et al. 1989, Quigley 1999).

Una PIO elevada va a generar tensiones, deformaciones y estrés mecánico en los tejidos oculares. En condiciones normales, el tejido conectivo de la cabeza del nervio óptico tiene cierta capacidad para deformarse y adaptarse al incremento de la PIO. Sin embargo en la senectud (Albon et al. 2000) o cuando los niveles de estrés exceden la tolerancia fisiológica, aparece una remodelación del tejido (Zeimer and Chen 1987). Aunque estas remodelaciones son un intento de volver a un entorno mecánico homeostático (Downs et al. 2011, Grytz et al. 2011); sin embargo, también pueden ser el resultado de la alteración y muerte de las CGRs (Agarwal et al. 2009). Al respecto, tanto en la retina como en la cabeza del nervio óptico de los ojos glaucomatosos, se ha observado una **alteración muy incipiente de los componentes de la MEC**, siendo ésta la que facilita la supervivencia, las funciones y la interconexión celular en el tejido (Werb 1997). Aparece una alteración del colágeno de tipo I, IV y VI, rigidez de las fibras elásticas, deposición de componentes de la membrana basal, cambios en el nivel de hidratación y de los tipos de glicosaminoglucanos, deposición de

ácido hialurónico, aumento del TGF- β 2 y de las MMPs, en particular de la MMP-1 y la MMP-9 (Cordeiro 2002, Grossmann 2002, Guo et al. 2005, Johnson et al. 1996, Pena et al. 1999).

Las MMPs son las principales enzimas de degradación de MEC; se ha visto cómo tras un incremento de la PIO aparece un aumento de la MMP-9, que se correlaciona con una reducción de laminina, un importante componente de la MEC en la CCG (Guo et al. 2005). Esta carencia de laminina dificulta las interacciones entre las células del tejido las cuales mueren por apoptosis (Grossmann 2002). Este incremento de MMP-9 parece estar también relacionado con el aumento de los receptores de glutamato en las células de la retina en el curso del glaucoma. (Zhang et al. 2004). La activación de los astrocitos observada tras el incremento de la PIO (Yan et al. 2000) podría ser una fuente importante de MMP-9 (Agapova et al. 2001).

Debido estas alteraciones de la MEC en los ojos glaucomatosos, los axones de las CGRs, van a sufrir deformaciones y por tanto un estrés mecánico a nivel de la lámina cribosa. Esto puede contribuir a la disfunción mitocondrial y consecuentemente a una menor producción de energía, lo que genera un **bloqueo del transporte axonal** retrógrado de factores neurotróficos como el BDNF (Crish et al. 2013, Quigley 1999). Estos factores son necesarios para la supervivencia neuronal y su ausencia puede conducir a la progresión de la muerte de las CGRs por apoptosis (Nickells 1996).

Junto a todo lo anterior, en respuesta a valores elevados de PIO, aparece un **incremento del TNF- α** (Nakazawa et al. 2006). Esta molécula parece contribuir a la neurodegeneración glaucomatosa de dos posibles formas; una dañando directamente los axones de las CGRs que tienen receptores para el TNF- α (Tezel et al. 2001a, Yuan and Neufeld 2001) y la otra induciendo la producción de NOS-2 en los astrocitos (Yuan and Neufeld 2000) que indirectamente dañará las CGRs.

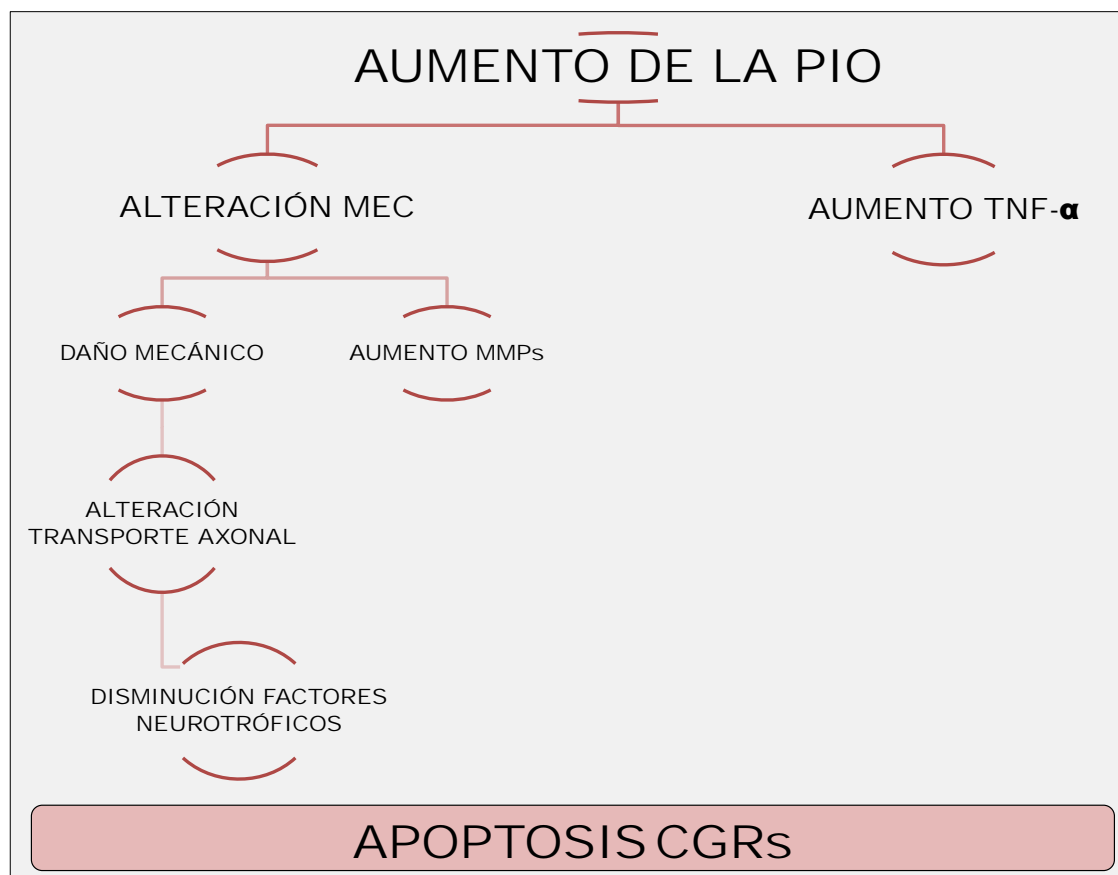


Figura 1.12. Mecanismos secundarios al incremento de PIO implicados en la apoptosis de CGRs. [Modificada Agarwal et al. 2009].

1.4.2.1.2 Células ganglionares de la retina en respuesta a la isquemia

A pesar de que una PIO elevada es un factor clave en la patología glaucomatosa, sin embargo, su regulación no garantiza la detención del proceso neurodegenerativo (Chauhan and Drance 1992, Rossetti et al. 1993, Tezel et al. 2001b). Si además de esto se tiene en cuenta que un 30-40% de los pacientes con defectos campimétricos glaucomatosos tienen valores normales de la PIO (Agarwal et al. 2009, Caprioli and Spaeth 1985), todo apunta a que otros factores deben estar participando activamente en el inicio y la evolución de esta neuropatía.

Curiosamente existe una alta prevalencia de glaucoma en sujetos con migrañas e hipo/hipertensión arterial, lo que sugiere que ciertos **procesos isquémicos** podrían estar comprometiendo la nutrición, y por tanto la supervivencia, de las CGRs en el curso de la

patología glaucomatosa (*Boland and Quigley 2007, Cursiefen et al. 2000, Gass et al. 1997, O'Brien and Butt 1999, Wang et al. 1997*).

En condiciones normales la retina y el nervio óptico requieren un flujo sanguíneo constante para mantener sus necesidades metabólicas; sin embargo, los pacientes glaucomatosos en general presentan una reducción del flujo sanguíneo ocular (*Chung et al. 1999, Flammer et al. 2002, Michelson et al. 1998, Satilmis et al. 2003*), especialmente aquellos con una presión arterial baja (*Grunwald et al. 1999*). El flujo sanguíneo en el ojo será dependiente no sólo de los valores de presión sistémica, sino también de los valores de la PIO (*Bill and Sperber 1990*). Al respecto, existe una relación entre la progresión del daño glaucomatoso y las fluctuaciones de la PIO, las bajadas de la presión sanguínea y las alteraciones de la autorregulación vascular (*Martínez 2013, Martinez and Sanchez 2005, Siesky et al. 2012*).

Aunque la presión diastólica baja es un factor de riesgo importante de glaucoma (*Bonomi et al. 2000*), se ha visto que además de la disminución del flujo sanguíneo que produce, su inestabilidad va a provocar un daño repetitivo de isquemia-reperusión (*Flammer and Mozaffarieh 2007*) en el tejido, asociado a la restauración del flujo sanguíneo durante procesos isquémicos leves y reversibles. El restablecimiento de la circulación, en vez de recuperar su función normal, produce la liberación de factores inflamatorios, como IL o radicales libres y la formación de especies reactivas de oxígeno (*Karageuzyan 2005*). Estos procesos parecen ser moderados pero repetitivos (*Flammer and Mozaffarieh 2007*) en la cabeza del nervio óptico de los sujetos glaucomatosos, lo que podrá agravar el curso de esta patología.

En los pacientes con glaucoma, se han observado concentraciones elevadas de un vasoconstrictor, la ET-1 (*Cellini et al. 1997, Cellini et al. 2012, Emre et al. 2005, Hollo et al. 1998, Noske et al. 1997, Rader et al. 1994, Tezel et al. 1997*) y de la MMP-9 (*Golubnitschaja-Labudova et al. 2000*), tanto en el plasma como en el humor acuoso, lo que va a contribuir al debilitamiento de la barrera hematorretiniana (*Golubnitschaja et al. 2004, Grieshaber and Flammer 2007*), y por tanto podría alterar la integridad neuronal en estos pacientes.

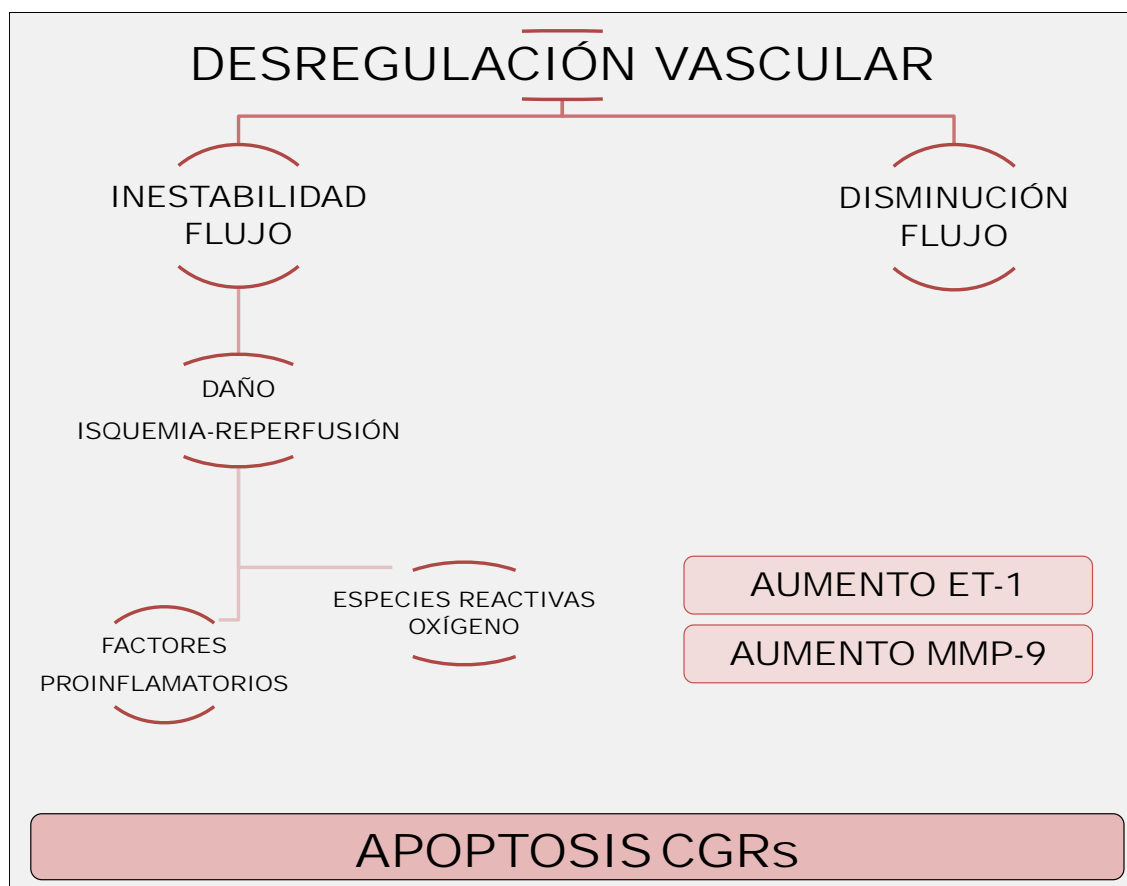


Figura 1.13. Mecanismos secundarios a la disregulación vascular implicados en la apoptosis de CGRs. [Modificada de Agarwal et al. 2009].

1.4.2.1.3 La inflamación y las células ganglionares de la retina

Además del daño mecánico y/o isquémico asociado a la neuropatía óptica glaucomatosa, ciertas respuestas inflamatorias mediadas por la inmunidad innata y/o la adaptativa, pueden estar relacionadas con la patogénesis del glaucoma (Tezel 2013).

Se ha visto que la presencia de estímulos neurodegenerativos, el estrés oxidativo o la activación de las células gliales en el glaucoma, pueden poner en marcha respuestas inmunes, que inicialmente podrían ser capaces de restaurar la homeostasis del tejido dañado, previniendo de esta forma la progresión de la enfermedad y restaurando la funcionalidad de los tejidos. Sin embargo, el estrés crónico asociado a esta patología parece desencadenar una reacción de tipo autoinmune, que exacerbaría el daño glaucomatoso (Tezel and Wax 2007, Tezel 2011, Tezel 2013, Wax and Tezel 2009). Por tanto, la cronicidad del estrés

parece ser un factor determinante entre una inmunidad protectora frente a una destructora.

Un fallo del control de las respuestas inmunes en el curso del glaucoma parece ser la causa de las **reacciones inflamatorias de tipo autoinmune** que se observan en esta patología. Al respecto, existe una mayor prevalencia de gammapatía monoclonal en los pacientes glaucomatosos (Gramlich et al. 2013, Hammam et al. 2008, Pinazo-Duran et al. 2013). Se ha observado un aumento de autoanticuerpos en el suero (Dervan et al. 2010, Joachim et al. 2008, Maruyama et al. 2000, Reichelt et al. 2008, Tezel et al. 1998, Tezel et al. 1999a, Yang et al. 2001b) y en el humor vítreo de estos pacientes (Joachim et al. 2007a) dirigidos contra algunos glicosaminoglucanos de la cabeza del nervio óptico (Tezel et al. 1999a) y una amplia variedad de antígenos retinianos. Entre éstos se encuentran entre otros la rodopsina (Romano et al. 1995), enolasas (Maruyama et al. 2000), la glutatión S-transferasa (Kokotas et al. 2012, Yang et al. 2001b), la fosfatidilserina (Kremmer et al. 2001) y de forma muy marcada las proteínas de shock térmico (HSP) (Kokotas et al. 2012, Tezel et al. 1998, Tezel et al. 2004, Wax et al. 1998b), como la HSP60, la HSP27 y las α -cristalinas (Huang et al. 2007, Joachim et al. 2007a, Joachim et al. 2007b, Tezel et al. 1998, Wax et al. 1998b). Estas proteínas protegen a las neuronas del daño oxidativo (Wax et al. 1998b) y de estímulos apoptóticos (Tezel et al. 1999b, Tezel and Wax 2000b) y se encargan de estabilizar el citoesqueleto celular y promover la reparación del tejido (Wax and Tezel 2009). Sin embargo, estas proteínas son muy antigénicas, lo cual puede ser consecuente con una respuesta autoinmune en multitud de patologías (Young 1992). Se ha visto que los altos niveles de autoanticuerpos presentes en los pacientes glaucomatosos se correlacionan con la apoptosis de las CGRs (Tezel et al. 1998, Tezel and Wax 2000b, Wax and Tezel 2009).

Además de este incremento de autoanticuerpos en el suero y en el humor acuoso de los pacientes glaucomatosos, también se ha observado la deposición en la retina de inmunoglobulinas y células plasmáticas (Gramlich et al. 2013, Wax et al. 1998a).

Las células gliales son la población residente de células inmunes de la retina y del nervio óptico. Es crucial que estas células sean capaces de responder rápidamente, y por tanto de activarse, ante cualquier tipo de daño para garantizar el privilegio inmune del que consta el tejido nervioso (Tezel et al. 2007). Se sabe que una **activación crónica de estas**

células es un indicador claro de que están teniendo lugar procesos neuroinflamatorios, bien de tipo innato o adquirido (Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009).

La ausencia de señales de inhibición glial procedente de las neuronas y un ambiente rico en sustancias proinflamatorias, parecen ser factores claves en la activación de las células gliales de la retina y del nervio óptico que se observan tanto en la patología humana (Hernandez and Pena 1997, Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Tezel 2013, Wang et al. 2002), como en los modelos de glaucoma experimentales (Inman and Horner 2007, Ju et al. 2006, Lam et al. 2003, Naskar et al. 2002, Ramírez et al. 2010, Tanihara et al. 1997, Wang et al. 2000a, Woldemussie et al. 2004). Una activación glial temprana, moderada y transitoria se ha correlacionado con una respuesta inmune de carácter neuroprotector, gracias a la eliminación de sustancias tóxicas del medio extracelular, como por ejemplo el glutamato, la secreción de factores de crecimiento como el BDNF, CNTF, PEDF, otras sustancias antiinflamatorias y la expresión de proteínas antiapoptóticas como la BCL-2 (Anderson and Swanson 2000, Johnson and Morrison 2009, Munemasa and Kitaoka 2012, Ridet et al. 1997). Sin embargo, la activación crónica de estas células induce la secreción de ciertas sustancias proinflamatorias, siendo la principal fuente de TNF- α , IL-1 (Boehm et al. 2011, Sappington and Calkins 2008, Tezel et al. 2001a, Tezel and Wax 2000a, Yan et al. 2000, Yang et al. 2011, Yuan and Neufeld 2000) y ON (Liu and Neufeld 2000, Morgan 2000, Neufeld et al. 1997). También son capaces de aumentar la secreción de sustancias que pueden alterar la estructura de la MEC, entre ellas, las MMPs (Agapova et al. 2001, Yan et al. 2000), resultando todo ello en cambios en el tejido que pueden exacerbar el curso de la patología (Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009).

Esta reactivación glial en el glaucoma se correlaciona también con un aumento de la expresión de otros factores ligados al sistema inmune, entre ellos diferentes componentes del complemento (Gramlich et al. 2013, Kuehn et al. 2006, Stasi et al. 2006, Tezel et al. 2010), los TLRs (Luo et al. 2010a) y el MHC-II (Ebnetter et al. 2010, Yang et al. 2001c).

La microglía está considerada el macrófago del SNC. Esta célula tras su activación se comporta como un fagocito y se encarga de eliminar las neuronas apoptóticas y los restos celulares en el glaucoma, gracias entre otros a los receptores de tipo Toll. Sin embargo, el

astrocito también presenta una gran variedad de receptores, como los de tipo Toll, receptores scavenger, receptores de manosa, implicados en este tipo de respuestas (Farina et al. 2007). Se ha visto que los TLRs podrían activarse en el glaucoma no sólo ante la presencia de restos neuronales, sino también ante la presencia de ciertos productos oxidativos o de proteínas antigénicas del propio tejido, como las HSPs. A través de la respuesta mediada por estos receptores, pueden activarse los linfocitos T y por tanto participar en la puesta en marcha de una respuesta inmune de tipo adaptativo en el glaucoma (Luo et al. 2010a). Además de estas respuestas de la glía residente en relación con la inmunidad innata, existe una migración transendotelial temprana de monocitos desde el torrente hacia el parénquima nervioso (Howell et al. 2012) teniendo esto consecuencias aún controvertidas en la fisiopatología del glaucoma (Howell et al. 2012, London et al. 2011).

El estrés crónico produce cambios funcionales en las CPAs y consecuentemente modificaciones en la respuesta inmune. Como hemos vistos, cuando las células gliales se activan aumenta su capacidad para comportarse como CPAs (Hernandez and Pena 1997, Tanihara et al. 1997, Tezel et al. 2003, Wang et al. 2000a, Wang et al. 2002). Al respecto, existe un incremento de la expresión de las moléculas del MHC-II en la microglia y en los astrocitos, tanto en pacientes glaucomatosos (Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Yang et al. 2001c) como en modelos animales (Ebnetter et al. 2010, Tezel et al. 2007), lo que podría estar en relación con una respuesta inmune mediada por células T.

Similar a lo que ocurre en otras enfermedades autoinmunes, en los pacientes con glaucoma se ha detectado una alteración sérica de las **poblaciones de linfocitos T**, y del **receptor de la IL-2** (Yang et al. 2001a) lo que sugiere que existe una respuesta inmune aberrante en la neuropatía óptica glaucomatosa (Huang et al. 2010). Asociado a la alteración de la barrera hematorretiniana que se observa en los pacientes glaucomatosos, las células T podrían acceder a la retina (Grieshaber and Flammer 2007, Tezel and Wax 2004). Una entrada de estas células podría estar en relación con ciertos mecanismos neuroprotectores, como la eliminación de los autoantígenos y las células dañadas del tejido. Sin embargo, la presentación de antígenos y la presencia de linfocitos de manera prolongada puede inducir

la entrada de nuevos linfocitos desde el torrente sanguíneo, los cuales pueden liberar citoquinas proinflamatorias que perpetuarán la respuesta inmune (Rieck 2013).

Hasta el momento, la mayor parte de los estudios han coincidido en que el glaucoma es una patología que no se caracteriza por una infiltración masiva de células T ni en la retina ni en el nervio óptico (Tezel 2013). A pesar de ello, no se puede descartar la participación de los linfocitos T en la fisiopatología del glaucoma; por un lado, parece que una pequeña infiltración podría ser responsable de un daño severo del SNC (Odoardi et al. 2007, Wekerle et al. 1987) y por otro, tras la transferencia adoptiva de linfocitos T en modelos de glaucoma, existe una infiltración precoz de estas células en la retina y la cabeza del nervio óptico, que a pesar de ser transitoria está asociada a un daño neuronal (Tezel et al. 2008). Por otro lado, se ha visto también que los linfocitos T de los pacientes glaucomatosos responden activamente a ciertas proteínas retinianas (Yang et al. 2007).

1.4.2.2 Mecanismos secundarios implicados en la patología glaucomatosa

1.4.2.2.1 Deprivación de neurotrofinas y células ganglionares de la retina

Las CGRs proyectan sus axones hacia regiones cerebrales específicas donde se están secretando activamente NTs, también denominadas factores neurotróficos, que son vitales para la supervivencia neuronal. Desde estas localizaciones, de forma continuada se transportan retrógradamente hasta el soma de las CGRs. Estas células responden a una gran variedad de NTs, pero las principales son: el BDNF, el CNTF y el GDNF (Crawford Downs et al. 2011, Sigal et al. 2010).

La interrupción del flujo axoplásmico que ocurre en el glaucoma, es consecuente con una alteración del aporte de NTs que puede comprometer la supervivencia de las CGRs dando lugar a un proceso apoptótico (Meyer-Franke et al. 1995, Nickells 1996). Sin embargo, las células gliales de la retina producen diversas NTs (Cui et al. 2002, Seki et al. 2005, Spalding et al. 2004, Vecino et al. 2002), entre las que destaca el BDNF (Cellerino and Kohler 1997, Herzog and von Bartheld 1998, Perez and Caminos 1995), lo que podría compensar en cierta manera el déficit inicial de estos factores (Di Polo et al. 1998, Peinado-Ramon et al. 1996, Thanos and Emerich 2005).

1.4.2.2 Glutamato y células ganglionares de la retina

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante en la retina de los vertebrados. Las CGRs hacen uso de él y posiblemente también las demás neuronas retinianas (Cotman et al. 1988). Sin embargo, concentraciones de glutamato por encima de los niveles fisiológicos son tóxicos para las neuronas (Lucas and Newhouse 1957, Olney 1969, Vorwerk et al. 1996). Como ya hemos visto, los astrocitos y las células de Müller, se encargan de recaptar este exceso de glutamato extracelular (Moreno et al. 2005) y transformarlo en glutamina, que no presenta toxicidad para las neuronas.

En el glaucoma está documentada la existencia de un aumento de la concentración de glutamato extracelular debido, bien a su liberación desde las CGRs que mueren (Dkhissi et al. 1999, Dreyer et al. 1996) o bien a un fallo en el mecanismo de recaptación y transformación del glutamato en las células gliales (Moreno et al. 2005, Naskar et al. 2000, Sullivan et al. 2006). Como consecuencia de la acumulación en el medio de este neurotransmisor, se produce una sobreestimulación de los receptores de glutamato, principalmente ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (Choi 1987, Choi et al. 1988, Kashii et al. 1994, Siliprandi et al. 1992), que va a provocar una entrada masiva de Ca^{+} a las neuronas (Choi and Rothman 1990). Esta sobrecarga de Ca^{+} contribuye a la neurotoxicidad y a la muerte de las CGRs por apoptosis (Choi 1987, Dreyer 1998, Manev et al. 1989, Shen and Slaughter 2002, Sucher et al. 1997).

1.4.2.3 Radicales libres, óxido nítrico, endotelina-1 y células ganglionares de la retina

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado orbitando en su capa más externa (McCord 1985) lo que las hace altamente inestables y reactivas. Estas especies se forman de manera fisiológica en presencia de oxígeno y radiación solar y se acoplan a átomos de hidrógeno de las moléculas de las membranas celulares con la finalidad de mantener un equilibrio termodinámico. Sin embargo, la peroxidación lipídica, como se conoce a este proceso entre estas especies reactivas y las membranas celulares, altera la permeabilidad celular comprometiendo su funcionalidad (Phillis 1994, Siesjo 1981).

En condiciones normales, durante el metabolismo aerobio celular, las mitocondrias producen de manera inevitable radicales libres, entre ellos el anión superóxido y grupos hidroxilos (*McCord and Fridovich 1978, Osborne 2010*). Dado que estas especies son tóxicas para las células, la retina está dotada de mecanismos antioxidantes endógenos muy eficaces que incluyen diversas enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (*Bhuyan and Bhuyan 1977, Gabelt and Kaufman 2005, Rao et al. 1985*), y ciertas sustancias con capacidades antioxidantes como el glutatión (*Ganea and Harding 2006*), el ácido ascórbico (*Friedman and Zeidel 1999, Woodford et al. 1983*), el tocoferol, el β -caroteno, la melatonina (*Lundmark et al. 2006, Reiter et al. 2003*) y la vitamina E (*Snodderly 1995*).

La formación excesiva de radicales libres es un factor etiopatogénico de muchas enfermedades oculares, entre ellas el glaucoma (*Chen and Kadlubar 2003*), donde la disregulación vascular o la isquemia pueden favorecer el estrés oxidativo (*Flammer et al. 1999*). Se ha visto que los pacientes con glaucoma presentan un potencial antioxidante significativamente reducido (*Ferreira et al. 2004, Pinazo-Duran et al. 2013*), una disminución de los niveles de glutatión (*Gherghel et al. 2005*) y un aumento de los productos de peroxidación lipídica (*Moreno et al. 2004, Pinazo-Duran et al. 2013, Yildirim et al. 2005*). De igual forma, tras un incremento experimental de la PIO, se ha observado en la retina una reducción de la superóxido dismutasa, la catalasa y de la melatonina (*Moreno et al. 2004*).

La presencia de especies reactivas genera estrés oxidativo en el tejido, bajo el cual las funciones endoteliales se modifican, en especial la producción de ON y de ET-1 (*Tamm et al. 1996, Wiederholt 1998*).

El **ON** en concentraciones fisiológicas juega un papel importante en el organismo. Por ejemplo, en las neuronas puede funcionar como neurotransmisor y su liberación por las células endoteliales estimula a las células musculares lisas vasculares produciendo vasodilatación. La síntesis de ON se realiza por acción de la enzima NOS. Existen tres isoformas de NOS (*Moncada and Higgs 1993*), dos denominadas constitutivas, la neuronal (nNOS o NOS-1) y la endotelial (eNOS o NOS-3), las cuales sintetizan ON en condiciones normales, y una inducible (iNOS o NOS-2), que no se expresa, o lo hace muy débilmente,

en condiciones fisiológicas (*Bredt and Snyder 1994, Knott and Bossy-Wetzel 2009, Lowenstein et al. 1994, Zhang and Snyder 1995*).

En los pacientes glaucomatosos parece existir un incremento de la expresión de la iNOS (*Motallebipour et al. 2005*) localizada en los astrocitos y la microglía reactiva (*Agarwal et al. 2009, Liu and Neufeld 2000, Neufeld et al. 1997, Wax and Tezel 2002*) que posiblemente sea responsable del exceso de ON observado en estos pacientes y en modelos experimentales de HTO (*Tsai et al. 2002*). Este exceso de ON puede alcanzar los axones de las CGRs, donde se localizan altas concentraciones del anión superóxido (generado por el daño de isquemia-reperusión) y se van a formar radicales muy reactivos, los peroxinitritos (*Lipton 1999*). El anión superóxido y los peroxinitritos son atrapados en los axones induciendo la apoptosis en las neuronas (*Flammer and Mozaffarieh 2007, Neufeld 1999b*).

La **ET-1** es un potente péptido vasoconstrictor (*Haynes et al. 1994, Yanagisawa et al. 1988*) que parece presentar cierta influencia sobre los vasos de la retina y la coroides, y sobre las neuronas y las células gliales (*Bausher 1995, MacCumber et al. 1989, MacCumber and D'Anna 1994, Ripodas et al. 2001*).

La ET-1 en concentraciones anormales se ha asociado con la apoptosis de las CGRs (*Chauhan et al. 2004, Wang et al. 2009*) y con otras alteraciones como la astrogliosis (*Prasanna et al. 2002, Prasanna et al. 2005, Rigosi et al. 2010*), alteraciones de la MEC (*Rao et al. 2008*), alteración del transporte axonal (*Hollander et al. 1995, Stokely et al. 2002*) y el incremento de ON (*Okuno et al. 2003*). Se ha observado que en los pacientes glaucomatosos existe un aumento de los niveles de ET-1 (*Cellini et al. 2012, Emre et al. 2005, Rader et al. 1994*), lo que parece implicarla en el curso de la patología (*Lau et al. 2006, Munemasa et al. 2008*).

1.5 El ratón como modelo experimental

Los roedores se han empleado rutinariamente en experimentación animal debido al bajo coste, la sencillez de su manejo (*Peters et al. 2007*) y en oftalmología, debido a las similitudes que presentan con la retina humana. El ratón además, gracias al conocimiento

de su genoma, posee una ventaja añadida, la posibilidad de ser manipulado genéticamente (McKinnon et al. 2009, Peters et al. 2007).

1.5.1 La retina de los ratones albinos

El albinismo es una condición genética caracterizada por la ausencia congénita de melanina, y por tanto de pigmentación. En los individuos no albinos la melanina localizada en los melanocitos, se sintetiza por acción de la enzima tirosinasa que transforma el aminoácido tirosina en melanina. Sin embargo, en los individuos albinos la tirosinasa tiene o poca o una actividad nula, por lo que no se produce esta transformación y por tanto tampoco la pigmentación del individuo.

En la retina, la melanina está presente en el EPR y ejerce una influencia clave en el desarrollo de la retina neurosensorial. Cuando esta proteína está ausente o disminuida, el desarrollo se altera (Jeffery and Kinsella 1992), observándose un retraso del crecimiento de las fibras nerviosas (Kliot and Shatz 1985), de la maduración (Webster and Rowe 1991) y la neurogénesis de la retina (Ilia and Jeffery 1996), que parece ser el origen de las alteraciones que sufren estos individuos en su etapa adulta.

En el albinismo es característico observar una retina central hipodesarrollada. Aunque la afectación abarca todas las capas retinianas, existe una afectación severa de la CNE, donde el número de bastones, aunque no el de conos, se encuentra reducido de una manera drástica (Jeffery et al. 1994). De igual forma se han observado alteraciones a nivel del quiasma óptico. En los mamíferos, aunque la mayoría de las CGRs proyectan contralateralmente, una pequeña parte lo hace ipsilateralmente. En albinos, estas últimas fibras modifican su patrón de proyección durante el desarrollo y terminan haciéndolo contralateralmente, formándose de esta manera mapas binoculares anómalos (Drager and Olsen 1980, Guillery 1986, Jeffery et al. 1994).

A pesar de todas estas anomalías, los animales albinos se emplean rutinariamente en el estudio de un amplio abanico de patologías oculares a nivel mundial y los resultados de todos ellos se extrapolan a los obtenidos de otros modelos no albinos.

1.5.2 Modelos experimentales de hipertensión ocular en roedores

Todas las ventajas que aportan los roedores sobre otros animales ha promovido su uso creciente para el estudio de ciertas patologías, entre ellas la neuropatía óptica glaucomatosa (Howell et al. 2008, Johnson and Tomarev 2010). A pesar de que los ratones carecen de lámina cribosa (May and Lutjen-Drecoll 2002), región que parece afectarse de manera precoz en el glaucoma humano, Mabuchi et al. (Mabuchi et al. 2004) demostraron que era posible inducir daño glaucomatoso de manera satisfactoria incluso en ausencia de esta estructura.

El aumento de la PIO es uno de los principales factores de riesgo de la neuropatía óptica glaucomatosa, pero no el único. Por ello los modelos desarrollados para el estudio de esta patología, pueden clasificarse básicamente en los que se fundamentan en un incremento de la PIO, los modelos de HTO, y por otro lado los que se desarrollan en presencia de valores de PIO normales.

La anatomía del sistema de drenaje del humor acuoso es la base para el desarrollo de los diferentes modelos experimentales de HTO (Morrison et al. 1995). Éstos difieren entre sí en los valores de PIO obtenidos, el momento en el cuál ésta alcanza su pico máximo y el periodo en el que permanece elevada (Cone et al. 2010, Morrison et al. 2005). Estos cambios, no sólo parecen ser dependientes de la técnica empleada, sino también, de la especie en la que se desarrolla el modelo (Chauhan et al. 2002, Cone et al. 2010, John et al. 1997, Savinova et al. 2001).

Los modelos de HTO pueden generarse de manera espontánea o inducida.

Los de **tipo espontáneo** tienen la ventaja de que el aumento la PIO se produce de manera gradual, similar a lo que ocurre con el glaucoma crónico de ángulo abierto en el humano; además, puesto que los animales no sufren ninguna manipulación experimental, se evita de esta forma encontrar otros procesos fisiopatológicos no asociados con el curso de la propia patología glaucomatosa. Sin embargo, la desventaja de estos modelos reside en que la evolución, los niveles y la duración de la PIO son difíciles de monitorizar, y por tanto los eventos más precoces de la patología son difíciles de determinar. Existen múltiples modelos espontáneos de HTO (Bouhenni et al. 2012, Johnson and Tomarev 2010, Pang and

Clark 2007, Weinreb and Lindsey 2005), entre ellos el ratón de la línea DBA/2J es el mejor caracterizado (Bayer et al. 2001, Buckingham et al. 2008, Filippopoulos et al. 2006, Howell et al. 2007, Jakobs et al. 2005, Libby et al. 2005a, Schlamp et al. 2006, Soto et al. 2008). Este ratón presenta una mutación recesiva en dos genes, lo que es consecuente con una atrofia del iris, una dispersión pigmentaria y el desarrollo de sinequias anteriores que producen el cierre del ángulo camerular. Esto lleva a un incremento de la PIO en torno a los 7-8 meses de vida del animal que permanece hasta su muerte (Schlamp et al. 2006).

En los **modelos inducidos de HTO** por lo general, el incremento de la PIO ocurre de forma relativamente predecible después de la manipulación experimental. Este hecho permite analizar de forma más precisa los cambios fisiopatológicos precoces secundarios al incremento de la PIO. Sin embargo, la subida de la PIO que se produce en estos modelos suele ser rápida y sus valores tan sólo se mantienen un periodo de tiempo relativamente corto. Dado que el glaucoma primario de ángulo abierto en el humano se caracteriza por tener una progresión lenta en el tiempo, las características de estos modelos podrían ser un inconveniente, ya que no mimetizan íntegramente la patología humana (Morrison et al. 2005). No obstante, se ha visto que inducen daños severos de la retina, como la pérdida de CGRs y una degeneración de la CFN, similar a los encontrados en los modelos espontáneos de HTO (Buckingham et al. 2008, Jakobs et al. 2005, Schlamp et al. 2006, Soto et al. 2008), lo que apoya a la existencia de mecanismos fisiopatológicos similares entre ambos.

Los modelos inducidos más relevantes se desarrollan asociados a la obstrucción de la vía clásica de drenaje del humor acuoso en los roedores: malla trabecular-canal de Schlemm-venas epiesclerales. En esta vía, el humor acuoso sale del ojo a través de una estructura localizada en el ángulo iridocorneal, la malla trabecular, hacia el canal de Schlemm, desde el que a través de numerosos canales colectores entra en un plexo venoso que rodea el limbo esclerocorneal para salir finalmente hacia la circulación general a través de las venas epiesclerales (Triviño et al. 1986). Entre estos modelos encontramos la inyección de suero salino en las venas epiesclerales, la inyección de sustancias en la cámara anterior, como microesferas o ácido hialurónico, y la fotocoagulación de estructuras relacionadas

con el drenaje del humor acuoso, como la malla trabecular, las venas epiesclerales o la conjunción de las venas epiesclerales y perilimbaires.

La **inyección de suero salino hipertónico** en las venas epiesclerales, produce una alteración de las membranas celulares debido a la hipertonicidad de la solución y una cicatrización de la malla trabecular, que será consecuente con el incremento de la PIO en ratas (Ahmed et al. 2004, Johnson et al. 2007, Kipfer-Kauer et al. 2010, McKinnon et al. 2003, Morrison et al. 1997). Este método induce incrementos valores de la PIO entre 0-30 mmHg los cuales se mantienen largos periodo de tiempo, incluso hasta cerca de 200 días en algunos casos (Johnson and Tomarev 2010).

La **introducción intracamerular de microesferas** de entre 5-15 μm de diámetro, solas (Chen et al. 2011, Crish et al. 2010, Samsel et al. 2011, Sappington et al. 2010) o junto a agentes viscoelásticos (Cone et al. 2010, Pease et al. 2011, Urcola et al. 2006), incrementa la resistencia de salida del humor acuoso y por tanto induce un aumento de PIO en ratas (Crish et al. 2010, Samsel et al. 2011, Sappington et al. 2010, Urcola et al. 2006) y en ratones (Chen et al. 2011, Crish et al. 2010, Pease et al. 2011, Sappington et al. 2010).

La **fotocoagulación láser** está diseñada para generar una congestión de las estructuras y las vías de drenaje del humor acuoso y por tanto un incremento de la PIO. Los diferentes modelos que se han desarrollado mediante esta técnica, han validado este método para inducir incremento consistentes de PIO, los cuales oscilan entre 5-40 mmHg (Johnson and Tomarev 2010), siendo incluso mayores en los casos de realizarse tratamientos repetidos. La duración de la HTO es transitoria, entre 2-6 semanas (Johnson and Tomarev 2010), sin embargo el deterioro de las CGRs y de sus axones se muestra como un fenómeno progresivo, incluso después de normalizarse los valores de la PIO (Levkovitch-Verbin et al. 2002b) similar a la patología glaucomatosa humana.

La fotocoagulación láser en los roedores se ha llevado a cabo en especies tanto albinas como pigmentadas. En los animales pigmentados la energía láser es absorbida por el pigmento del tejido, siendo esto consecuente con que el daño final sea impredecible y variable, pero en cualquier caso superior a lo deseado inicialmente. Asociado a ello se

producen reacciones inflamatorias exacerbadas que podrían estar participando en el curso de la patología glaucomatosa. Sin embargo, parece que el uso creciente de especies albinas ha conseguido paliar estos problemas (Johnson and Tomarev 2010).

La **fotocoagulación láser de la malla trabecular** fue un modelo desarrollado en monos (Gaasterland and Kupfer 1974, Quigley and Hohman 1983) y posteriormente se modificó para emplearse en ratas (Aihara et al. 2003a, Grozdanic et al. 2003a, Levkovitch-Verbin et al. 2002a, Levkovitch-Verbin et al. 2002b, Salinas-Navarro et al. 2010, Ueda et al. 1998, WoldeMussie et al. 2001, Woldemussie et al. 2004).

En la **fotocoagulación de las venas episclerales**, dos o tres de estas venas son obliteradas obstaculizándose de esta forma el drenaje del humor acuoso debido al bloqueo del flujo venoso general. Este modelo es empleado tanto en ratas (Ahmed et al. 2001, Danias et al. 2006, Garcia-Valenzuela et al. 1995, Grozdanic et al. 2003b, Levkovitch-Verbin et al. 2002b, Mittag et al. 2000, Neufeld et al. 1999, Neufeld et al. 2002, Sawada and Neufeld 1999, Shareef et al. 1995, Urcola et al. 2006) como en ratones (Grozdanic et al. 2003a, Ruiz-Ederra and Verkman 2006).

De manera similar a lo que ocurre en la fotocoagulación de las venas episclerales, la **fotocoagulación de las venas episclerales y limbares** (Figura 1.14) de manera conjunta produce un incremento de la PIO tanto en ratas (Ramírez et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2008, Salinas-Navarro et al. 2009c, Salinas-Navarro et al. 2010, WoldeMussie et al. 2001) como en ratones (Cuenca et al. 2010, Gross et al. 2003, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008).

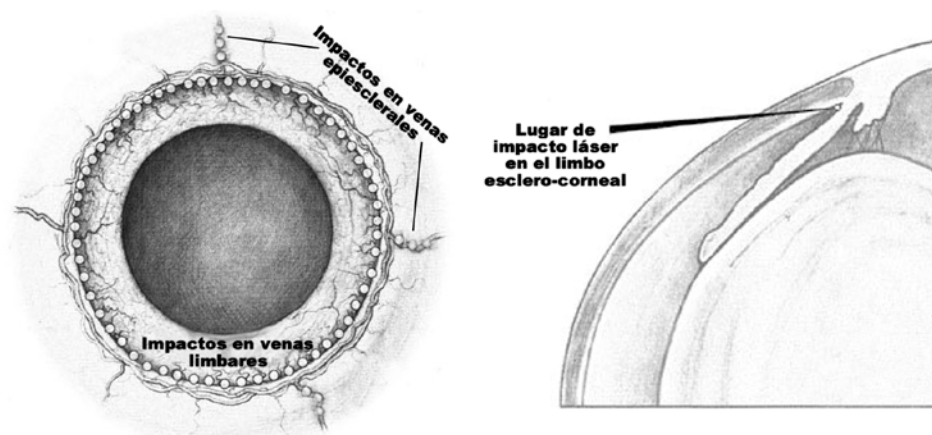


Figura 1.14. Esquema del modelo de HTO mediante la fotocoagulación láser de las venas episclerales y limbares. Regiones de impacto láser. La oclusión de estos vasos sanguíneos, indujo una HTO experimental asociada a la resistencia del drenaje del humor acuoso a través de la vía clásica o trabecular. [Modificadas de Levkovitch-Verbin et al. 2002b].

Justificación y Objetivos

2 Justificación y Objetivos

2.1 Justificación e hipótesis

La alta prevalencia de la neuropatía óptica glaucomatosa, junto a que su diagnóstico se basa mayoritariamente en la detección de la muerte irreversible de las CGRs, hace necesario el desarrollo de estudios encaminados a una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatogénicos del glaucoma.

El sistema inmune, y por tanto las células gliales como la población residente de células inmunes del sistema nervioso central, parecen estar jugando un papel clave en la patología glaucomatosa. Sin embargo, no está claro si las respuestas inflamatorias mediadas en esta enfermedad son consecuentes a la muerte de las células ganglionares de la retina o por el contrario podrían ser un mecanismo que precediera y diera lugar al daño de estas células.

Actualmente se conoce poco sobre los estadios más incipientes del glaucoma, sin embargo es probable que en la retina se estén produciendo cambios tempranos que antecedan a la afectación de las células ganglionares de la retina. El esclarecimiento de estos mecanismos podría ser el punto de partida para el desarrollo de nuevas terapias de carácter neuroprotector, lo cual mejoraría el panorama sanitario de esta enfermedad. Característicamente, la neuropatía óptica glaucomatosa suele ser un fenómeno de afectación bilateral, pero asimétrico en el tiempo; es decir, el daño que comienza en uno de los ojos terminará apareciendo, aunque de manera más tardía, en el ojo contralateral. Por tanto, las terapias neuroprotectoras podrían por un lado conservar el tejido nervioso superviviente del ojo afecto en el caso de una detección tardía de la enfermedad, pero también por otro, participar en la protección neuronal del ojo contralateral inicialmente sano, que tendrá muchas posibilidades de desarrollar glaucoma a largo plazo.

La hipertensión ocular es uno de los principales factores de riesgo de la patología glaucomatosa, sin embargo, el control de la presión intraocular no siempre consigue detener la evolución de la neurodegeneración asociada a esta enfermedad. Así pues, la

hipótesis de partida de este trabajo apuesta por la existencia de otros mecanismos implicados en la fisiopatología glaucomatosa. Teniendo en cuenta la implicación de la macro y microglía en el soporte neuronal y en la regulación de las respuestas inmunes, estas poblaciones celulares podrían estar participando de manera precoz en la puesta en marcha de los mecanismos inflamatorios asociados al glaucoma.

2.2 Objetivos

Diversos trabajos han probado la eficacia de la fotocoagulación láser de las venas episclerales y perilimbares en los ratones para inducir hipertensión ocular (Cuenca et al. 2010, Gross et al. 2003, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008). Esta maniobra genera un incremento agudo y transitorio de la presión intraocular, que será consecuente con la muerte de las células ganglionares de la retina, el daño de sus axones y la afectación neuronal del resto de la retina (Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a), características propias de la neuropatía óptica glaucomatosa humana.

Tomando este modelo como base, el **objetivo general** de este trabajo ha sido caracterizar cualitativa y cuantitativamente las células ganglionares de la retina NF-200+ y la respuesta de la macroglía (los astrocitos y las células de Müller) y de la microglía retiniana, en un modelo unilateral de hipertensión ocular en el ratón albino Swiss adulto, tanto en el ojo hipertenso como en su ojo contralateral no tratado (normotenso).

2.2.1 Objetivos específicos

A los 15 días de la inducción unilateral de la hipertensión ocular, y haciendo uso de técnicas de inmunofluorescencia, este estudio pretende de manera específica:

- Analizar las células ganglionares de la retina NF-200+.
- Caracterizar la respuesta de los astrocitos GFAP+ de la retina.
- Caracterizar la respuesta de las células de Müller GFAP+ de la retina.
- Determinar el comportamiento de las células Iba-1+ de la retina.
- Explorar las relaciones: células ganglionares de la retina NF-200+/macroglía GFAP+ y células ganglionares de la retina NF-200+/ células Iba-1+.

De igual forma, se analiza:

- El patrón de expresión en las células gliales de la retina de moléculas relacionadas con el sistema inmune, en particular las del MHC-II y el CD68.

Material y Métodos

3 Material y Métodos

En este apartado quedan descritas las diferentes estrategias experimentales desarrolladas en este estudio. Se describe la muestra experimental y su manejo, la caracterización del modelo de HTO, el instrumental empleado y los protocolos de procesamiento y análisis de la muestra.

3.1 Animales de experimentación y anestesia

Se emplearon **ratones albinos machos de la cepa Swiss**, de doce semanas postnatales (adultos), de entre 40-45 g de peso (Figura 3.1). Todos los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Murcia.



Figura 3.1. Muestra experimental. Ratones albinos Swiss.

Los ratones se mantuvieron en jaulas, dentro del animalario, con control de temperatura ambiente (23-24°C), en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad bajo una intensidad luminosa de entre 9-24 luxes. Todos ellos disponían de alimento y agua “*ad libitum*”. La experimentación se realizó de acuerdo a la normativa europea y nacional vigente, específicamente según lo dispuesto en la Directiva 2010/63/EU (*The European Parliament and of the Council 2010*), que sustituye a la Directiva 86/609/CEE, y en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE 8-2-2013) (*RDL 53/2013 de 8 de febrero*) (corrección de errores en BOE 26-4-2013) que deroga el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 21-10-2005). También se siguieron las directrices del “Handbook for the Use of Animals In Biomedical Research”

publicado por ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) para el uso de animales en investigación oftalmológica y del sistema visual con el fin de minimizar tanto el número de animales sacrificados así como el sufrimiento de los mismos (*The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2009*).

Todas las manipulaciones experimentales se llevaron a cabo bajo anestesia general, mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (75 mg/Kg Kyolar[®]. Parke-Davies S.L. Barcelona, España) y xilacina (10 mg/Kg, Rompún[®]. Bayer S.A. Barcelona, España) en 0,1 ml de suero salino al 0,9%. Las manipulaciones quirúrgicas se llevaron a cabo con la ayuda del instrumental apropiado bajo un microscopio quirúrgico OPMI-11-FC (Carl Zeiss. Alemania) instalado sobre una columna S-21 (Carl Zeiss. Alemania).

En el postoperatorio inmediato, se aplicó en la córnea de los animales un ungüento oftalmológico con tobramicina (Tobrex[®]. Alcon-Cusi S.A. Barcelona, España) para prevenir la desecación y las posibles lesiones corneales.

3.2 Caracterización del modelo de hipertensión ocular

El desarrollo del modelo en los ratones albinos Swiss, y todo el proceso que tuvo lugar hasta el sacrificio y enucleación de los globos oculares, se llevó a cabo por el grupo de investigación de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, dirigido por el profesor Manuel Vidal-Sanz. Tras ello, los ojos de los animales fueron enviados en frío al Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, en la Universidad Complutense de Madrid, para la disección y caracterización de las retinas.

3.2.1 Grupos experimentales

La muestra completa del estudio contó con 58 ojos de ratones albinos Swiss. De este total, 16 ojos fueron utilizados bien para la puesta a punto de las técnicas experimentales, o bien fueron descartados por anomalías del tejido. Los 42 ojos restantes se emplearon para el análisis experimental del modelo y por tanto contribuyeron a los resultados finales.

La muestra fue dividida en dos grupos de estudio:

- I. **Grupo de HTO.** El tejido limbar de los ojos izquierdos de estos animales fue fotocoagulado con láser, produciéndose un incremento unilateral de la PIO. En este grupo se analizaron tanto los ***ojos con HTO (ojos-HTO)*** (n=15) como los ***ojos contralaterales no tratados*** (n=15).
- II. **Grupo control de edad** (n=12). Ninguno de los dos ojos de estos animales fueron fotocoagulados, por lo que los valores de PIO debían encontrarse en rangos normales.

Dos semanas después de la inducción de la HTO, los animales se sacrificaron mediante la administración intraperitoneal de una sobredosis letal de pentobarbital sódico al 20% (0,5-1,0 ml.) (Dolethal®. Vetoquinol Especialidades Veterinarias S.A. Alcobendas, Madrid, España). Dado que el grupo de HTO estaba pareado por edad con el control de edad, estos últimos se sacrificaron en el mismo momento que los animales fotocoagulados.

3.2.2 Inducción de la hipertensión ocular

Para inducir un incremento de PIO, se fotocoagularon las venas episclerales y limbares de los ojos izquierdos de los animales, alterando de este modo la vía trabecular o convencional de drenaje del humor acuoso (Figura 3.2). Previa anestesia del animal, la fotocoagulación se realizó en una única sesión mediante un láser de diodo (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France), aplicado directamente sobre los tejidos sin la interposición de ninguna lente. Los parámetros de fotocoagulación utilizados fueron 0,3 W de potencia, 0,5 s de exposición y 100 µm de diámetro del haz, realizándose una media de 60 impactos sobre el tejido (Alarcon-Martinez et al. 2007, Salinas-Navarro et al. 2006, Salinas-Navarro et al. 2007, Salinas-Navarro et al. 2009a).

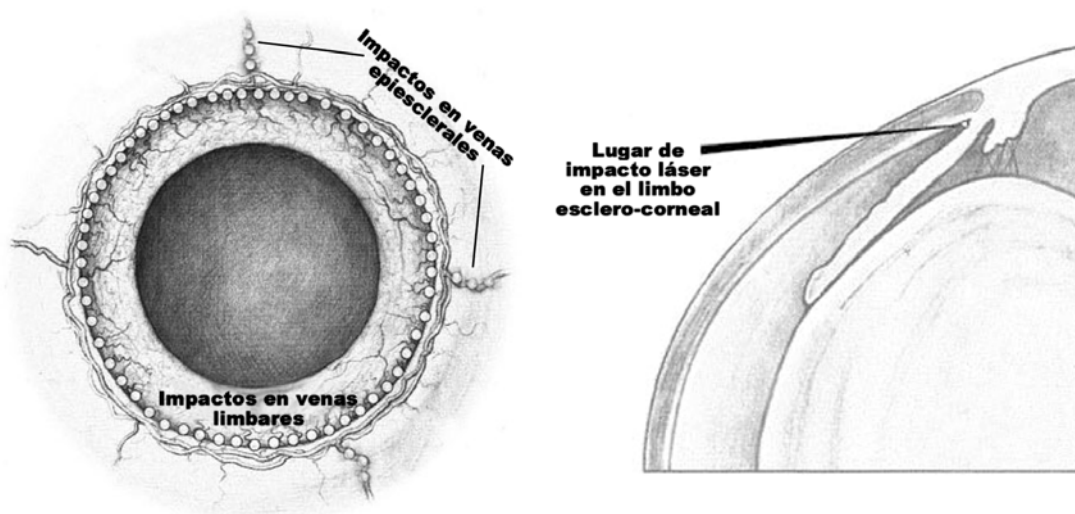


Figura 3.2. Esquema del modelo de HTO mediante la fotocoagulación láser de las venas episclerales y limbares. Regiones de impacto láser. La oclusión de estos vasos sanguíneos, indujo una HTO experimental asociada a la resistencia del drenaje del humor acuoso a través de la vía clásica o trabecular. [Modificadas de Levkovitch-Verbin et al. 2002b].

3.2.3 Medida de la presión intraocular

Los valores de PIO se tomaron en ambos ojos bajo anestesia general con un tonómetro de rebote (*Danias et al. 2003, Kontiola 2000, Kontiola et al. 2001*) especial para roedores (TonoLab[®], Tiolat OY, Helsinki, Finlandia) (*Pease et al. 2006, Pease et al. 2011, Saeki et al. 2008, Wang et al. 2005b*) (Figura 3.3).

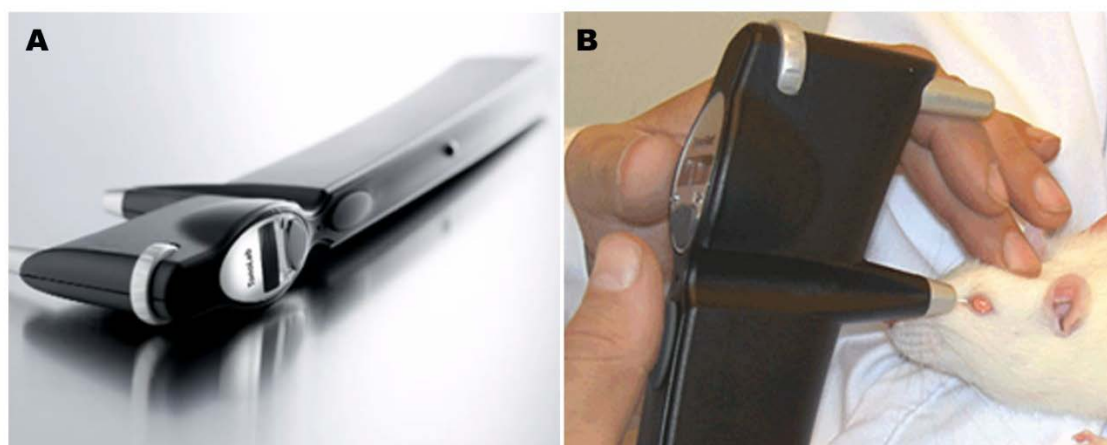


Figura 3.3. Medida de la PIO. Tonómetro de rebote TonoLab[®] y posición correcta para la toma de medidas de la PIO en los roedores.

En el grupo de HTO las medidas se realizaron, previa inducción de la HTO, a las 24 horas, 48 horas y a la semana del tratamiento láser. En el grupo control de edad, los valores de PIO se tomaron justo antes del momento de su sacrificio.

Dado que se pueden registrar fluctuaciones en el valor de la PIO debido al ritmo circadiano (*Aihara et al. 2003b*), las medidas se tomaron siempre por la mañana y a la misma hora. Para minimizar el posible error en la toma de medidas, se realizaron seis tomas consecutivas de la PIO de cada ojo, siendo cada una de ellas la media de otras seis medidas registradas automáticamente por el tonómetro.

3.3 Procesamiento de la muestra

Una vez finalizado el periodo experimental todos los ojos se procesaron para su estudio histológico.

3.3.1 Perfusión y fijación

Después de la administración intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico al 20% (0,5-1,0 ml) (Dolethal[®]; Vetoquinol Especialidades Veterinarias S.A. Alcobendas, Madrid, España), pero manteniendo aún el latido cardiaco, se colocó al animal bajo una campana de extracción de gases en posición decúbito supino. Para poder llevar a cabo una perfusión transcardiaca, se realizó una esternotomía media, que expuso el corazón y los grandes vasos torácicos; posteriormente, a través del ventrículo izquierdo, se introdujo un catéter de 14G en la aorta ascendente, e inmediatamente después se realizó una incisión en la aurícula derecha que permitiese la salida de la sangre y del líquido de perfusión. Paralelamente se realizó un clampaje de la aorta descendente para permitir tan sólo la perfusión de la mitad superior del animal (Figura 3.4).

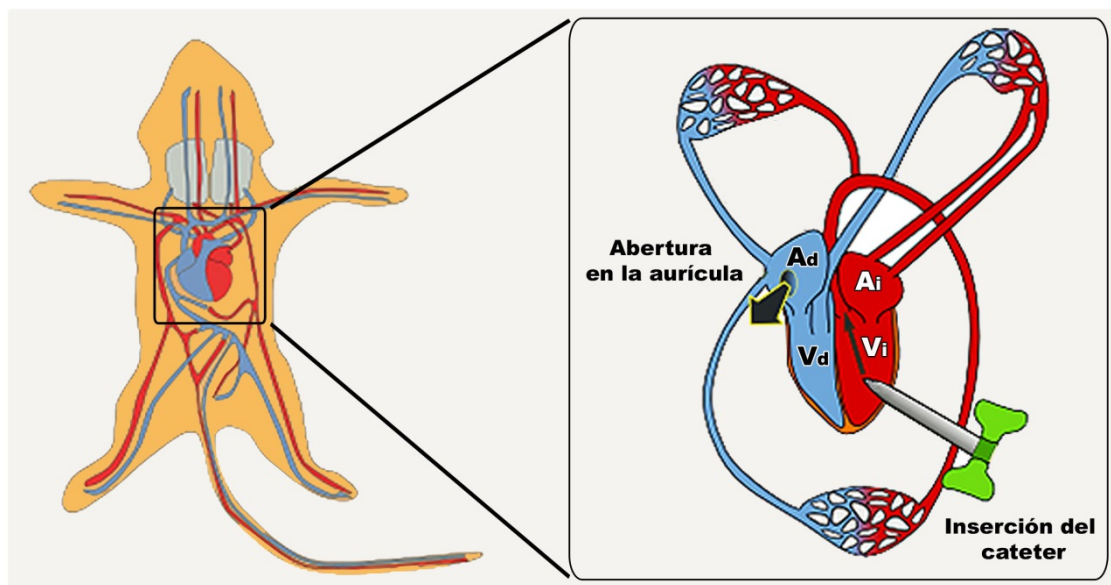


Figura 3.4. Perfusión y fijación animal. Esquema del corazón del ratón. La fijación de los tejidos se produjo mediante la perfusión de una solución de paraformaldehído a través de la aorta ascendente. [Ad: aurícula derecha; Vd: ventrículo derecho; Ai: aurícula izquierda; Vi: ventrículo izquierdo. Modificadas de <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-metodos-fijacion.php>].

En primer lugar, se perfundió el animal con una solución salina al 0,9% durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el contenido hemático de los vasos sanguíneos. Terminado este paso de lavado, y para obtener la fijación de los tejidos, se perfundió al animal durante 15 minutos con 200 ml de una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 a 4°C.

Para poder realizar análisis comparativos detallados de la muestra, la orientación espacial de las retinas es una condición indispensable. Por ello, en el momento del sacrificio, en los animales anestesiados pero aún sin perfundir, se dio un punto de sutura en el párpado superior de ambos ojos. La longitud de los cabos fue lo que indicaba estar ante un ojo derecho, cabos de igual longitud, o ante un izquierdo, un cabo largo y otro corto.

Una vez concluido el proceso de fijación, los globos oculares se enuclearon y se postfijaron durante 2 horas a 4°C sumergidos en una solución de paraformaldehído, igual a la empleada durante la perfusión. Finalmente, los ojos se transfirieron a tampón fosfato salino 0,1M y pH 7,4 y se mantuvieron en nevera a 4°C hasta su disección.

3.3.2 Disección de las retinas para microscopía óptica. Montajes planos de retina

Una vez fijados y orientados los globos oculares, se extrajeron las retinas con ayuda de un estereomicroscopio Wild M5 (Wild Heerbrugg, Leica. Suiza) que garantizó una disección fina de los tejidos. Todos los procedimientos de disección se realizaron con el tejido sumergido en tampón fosfato salino, 0,1 M y pH 7,4, manteniéndolo frío mediante hielo picado.

En primer lugar, con la ayuda de unas microtijeras Vannas, se realizó una incisión de 360° alrededor del limbo esclerocorneal que permitió disecar la córnea. A través de esta apertura en el globo ocular a continuación se extrajo en bloque el iris, el cristalino y el cuerpo ciliar, quedando de esta forma aislado el casquete formado por la esclera, la coroides y la retina. Con la finalidad de conservar la orientación espacial de las retinas, antes de su disección, se realizó un amplio corte radial en la zona superior, lugar donde se localizaba el punto de sutura realizado previamente, desde la zona de la ora serrata hasta las proximidades del nervio óptico. A continuación, haciendo uso de un pincel fino se disecó la retina separándola de la coroides. En este punto, con el fin de aplanar la retina dada su concavidad, se hicieron otros tres cortes radiales menos amplios que el del lado superior, en las zonas inferior, nasal y temporal. Finalmente se eliminó el cuerpo vítreo mediante el uso de pinzas de relojero y tijeras de microcirugía Vannas (Figura 3.5).

Una vez separadas las retinas, éstas se procesaron de manera inmediata o fueron congeladas para su posterior utilización. En el primer caso, las retinas se introdujeron en tampón fosfato salino 0,1 M y pH 7,4 y se mantuvieron en nevera a 4°C hasta su utilización. En el segundo caso, las retinas se introdujeron en sacarosa al 30% en tampón fosfato salino 0,1 M y pH 7,4 durante una noche y posteriormente se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Los tejidos congelados se guardaron en un arcón de -80°C hasta su utilización.

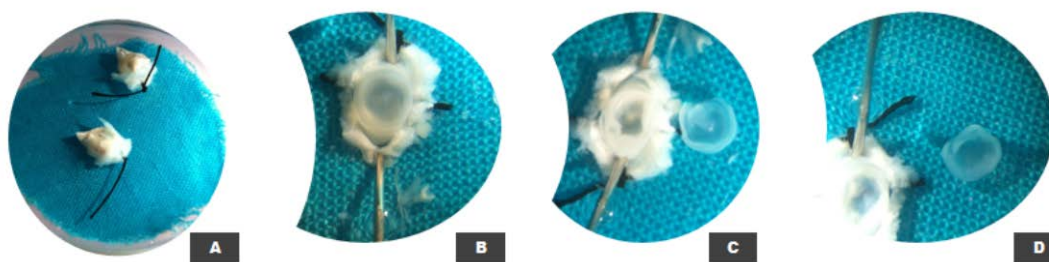


Figura 3.5. Disección de la retina. A: ambos globos oculares del ratón donde se aprecia el ojo izquierdo en la parte inferior (cabos de sutura de diferente longitud) y el ojo derecho en la parte superior (cabos de igual longitud). B: globo ocular aún sin diseccionar donde se ve expuesto el polo anterior. C: globo ocular donde se ha disecado el polo anterior y el cristalino (derecha). D: globo ocular con su retina (derecha) disecada.

3.3.3 Procesamiento histológico de las retinas. Técnicas inmunohistoquímicas

3.3.3.1 Estudio de las poblaciones celulares y anticuerpos

Todas las retinas fueron procesadas como montajes planos y en ellas se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos con el fin de caracterizar histológicamente las Células ganglionares de la retina y la población de células gliales de la muestra.

Brevemente como recordatorio, entre los anticuerpos empleados podemos destacar que (Tabla 3.1):

- El **anti-NF-200** es un anticuerpo que reconoce los NFs, los cuales forman las proteínas principales del citoesqueleto de las neuronas maduras.
- El **anti-GFAP** es un anticuerpo que se une a la GFAP, proteína principal de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos. En condiciones normales las células de Müller presentan una baja concentración de estas proteínas, pero su expresión aumenta en condiciones patológicas del sistema nervioso.
- El **anti-Iba-1**, también conocido como AIF-1, es un anticuerpo que se une a una proteína de membrana de las células del linaje de los monocitos/macrófagos, por tanto está presente en las células dendríticas, los macrófagos y la microglía, pero no en las neuronas ni en los astrocitos.

- El **anti-MHC-II** es un anticuerpo que reconoce las moléculas del MHC-II, presentes en las membranas de las CPAs.
- El **anti-CD68**, también conocido como ED-1, es un anticuerpo que reconoce una glicoproteína de membrana lisosomal en las células de linaje de los monocitos/macrófagos con capacidad fagocítica, pudiendo observarse por tanto en las células microgliales activadas en estado fagocítico.

Dado que los anticuerpos empleados no estaban marcados con ningún elemento que pudiese ser detectado bajo el microscopio (ej. fluorocromo o peroxidasa), se emplearon técnicas inmunohistoquímicas indirectas. En ellas, la señal de la reacción antígeno-anticuerpo se pone de manifiesto incorporando varias capas de anticuerpos. En nuestro estudio, se empleó la técnica de la **inmunofluorescencia indirecta**. En un primer paso, el anticuerpo primario reconoce el antígeno en cuestión mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se incorpora un anticuerpo secundario unido químicamente a una sustancia fluorescente, que reconocerá específicamente al anticuerpo primario y revelará de manera fluorescente la reacción antígeno-anticuerpo (Figura 3.6). Los anticuerpos secundarios empleados en el estudio quedan recogidos en la Tabla 3.2.

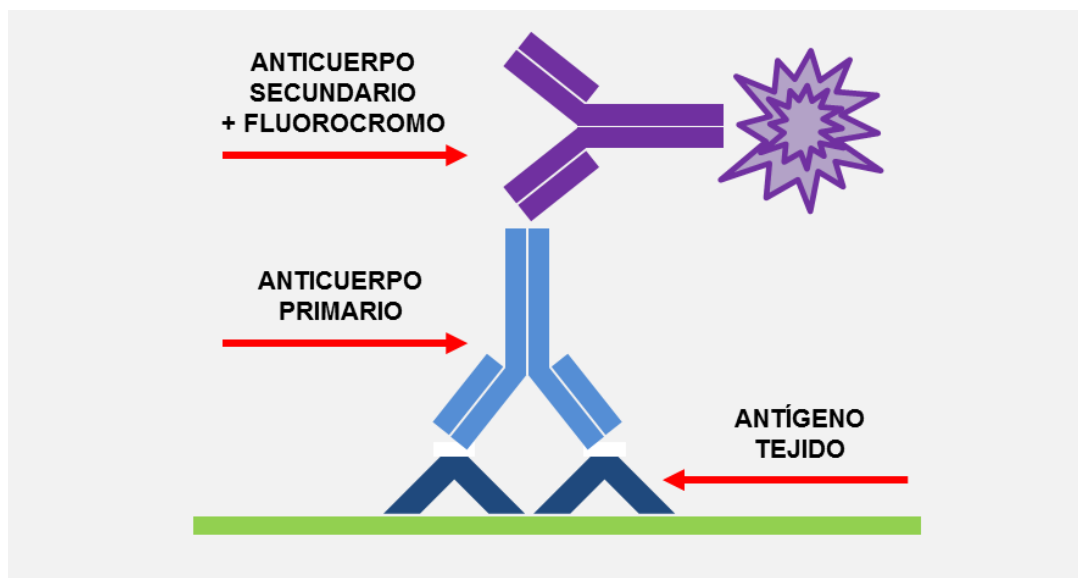


Figura 3.6. Inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos primarios se unen específicamente a los antígenos del tejido. Esta unión se revela mediante su interacción con una segunda capa de anticuerpos. Este segundo anticuerpo, o anticuerpo secundario, lleva unida una molécula fluorescente detectable al microscopio.

Anticuerpo	Tipo	Procedencia	Concentración
Rabbit anti-NF200	Policlonal	Sigma-Aldrich	1:80
Mouse anti-GFAP	Monoclonal (clon GA5)	Sigma-Aldrich	1:150
Chicken anti-GFAP	Policlonal	Millipore	1:100
Rabbit anti-Iba-1	Policlonal	Wako	1:500
Rat anti-mouse MHC-II	Monoclonal	eBioscience	1:100
Rat anti-mouse CD68	Policlonal	AbD Serotec	1:40

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios. Detalle de los anticuerpos empleados en el estudio, nombre, tipo, casa comercial y concentración de trabajo empleada.

Anticuerpo	Procedencia	Concentración
Texas Red goat anti-rabbit	Vector	1:50
FITC goat anti-mouse	Sigma-Aldrich	1:100
DyLight 405 donkey anti-chicken	Jackson ImmunoResearch	1:100
Alexa-Fluor 594 donkey anti-rabbit	Invitrogen	1:800
Alexa-Fluor 488 goat anti-rat	Invitrogen	1:150

Tabla 3.2. Anticuerpos secundarios. Detalle de los anticuerpos empleados en el estudio, nombre y casa comercial, especie y concentración de trabajo.

Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios a antígenos del tejido, las retinas se incubaron (ver protocolo) en una solución de bloqueo, que contenía el suero del animal en el que estaba desarrollado el anticuerpo secundario. Fueron necesarios en el estudio los siguientes sueros animales (Tabla 3.3).

Sueros	Procedencia
Normal Donkey Serum	Millipore
Goat Serum	Sigma-Aldrich

Tabla 3.3. Sueros animales purificados. Detalle de los sueros empleados en el estudio, nombre y casa comercial.

3.3.3.2 Protocolo de inmunofluorescencia indirecta

El protocolo empleado en el procesamiento de las retinas mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta responde a:

1. **Lavado del tejido con PBS** (3 x 30 min).
2. **Eliminación del background.** Las retinas se incubaron durante toda la noche con una solución compuesta por: sueros de bloqueo al 10% (suero de cada especie en la que están desarrollados los anticuerpos secundarios), TX-100 al 0,2% y PBS.
3. **Incubación con los anticuerpos primarios. Primera capa.** Las retinas se sumergieron durante tres días en una disolución compuesta por: los anticuerpos primarios a la concentración de trabajo, sueros de bloqueo al 1% (suero de cada especie en la que están desarrollados los anticuerpos secundarios), TX-100 al 0,2% y PBS.
4. **Lavado del tejido con PBS** (3 x 30 min). Este paso eliminó los restos de anticuerpos primarios que no habían reaccionado con el tejido.
5. **Incubación con los anticuerpos secundarios. Segunda capa.** Las retinas se sumergieron durante tres días en una solución de PBS en la que se encontraban disueltos los anticuerpos secundarios a la concentración de trabajo.
6. **Lavado del tejido con PBS** (3 x 30 min). Este paso eliminó los restos de anticuerpos secundarios que no habían reaccionado con el anticuerpo primario y que quedaban libres en el tejido pudiendo generar señales indeseables.
7. **Montaje del tejido. Montajes planos de retina.** Las retinas se montaron “*in toto*” sin deshidratar, usando para evitar la pérdida de fluorescencia

Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, S.L., Burlingame, U.S.A) con/sin DAPI. La superficie vítrea de la retina se colocó hacia arriba en el portaobjetos, en contacto directo con el cubreobjetos. Una vez cubiertas las retinas, para evitar el escape del medio de montaje, los bordes del cubreobjetos fueron sellados contra el portaobjetos mediante laca de uñas.

En todos los estudios se realizaron controles de rutina para garantizar la especificidad del inmunomarcaje realizado. Para ello, durante la incubación, se procedió a eliminar los:

- **anticuerpos primarios**, para determinar las posibles uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
- **anticuerpos secundarios**, para determinar la presencia de autofluorescencia del tejido.

Debido a que en el estudio se realizaron técnicas de inmunotinción múltiples (dobles y triples), se añadieron controles adicionales para detectar posibles cruces inespecíficos entre los anticuerpos primarios y secundarios, tal y como queda reflejado de forma esquemática en la Tabla 3.4.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Primario A	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Primario B	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Primario C	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Secundario A	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Secundario B	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Secundario C	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Tabla 3.4. Controles de inmunohistoquímica. Esquema de los controles de las técnicas inmunohistoquímicas múltiples. El símbolo “+” indica la presencia del/los anticuerpo/s y el símbolo “-” la ausencia del/los mismo/s. [C: control].

3.4 Estudio morfométrico de la retina

3.4.1 Caracterización de la macroglía GFAP+ y de las células ganglionares de la retina NF-200+

3.4.1.1 Generalidades del análisis

Para la caracterización cualitativa y cuantitativa de las retinas de la muestra, se realizaron inmunofluorescencias indirectas con los anticuerpos primarios mouse anti-GFAP y rabbit anti-NF-200, utilizando como anticuerpos secundarios el FITC goat anti-mouse y el Texas Red goat-anti rabbit respectivamente.

Los montajes planos de retina se analizaron y fotografiaron mediante el microscopio confocal espectral TCS SP2 AOBS® (Leica. Alemania) empleando un láser de Ar/ArKr (488 nm) y otro de HeNe (543/594 nm), seleccionando las longitudes de onda correspondientes a la emisión del FITC (isotianato de fluoresceína o fluorescein isothiocyanate) para el estudio de la población macroglial GFAP+, y del Texas Red para analizar la inmunorreacción NF-200+. También se utilizó un microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania) junto con los filtros adecuados que permitían nuevamente observar el espectro de emisión del FITC (Filter set 10. Carl Zeiss. Alemania) y del Texas Red (Filter set 15. Carl Zeiss. Alemania), capturándose las imágenes con la cámara digital de alta resolución CoolSNAP (Photometrics. EEUU) acoplada a este microscopio (Tabla 3.5 y Figura 3.7).

Fluorocromo	Absorción	Emisión	Detección celular
FITC	495 nm	517 nm	Astrocitos y células de Müller
Texas Red	595-604 nm	606-615 nm	CGRs y sus axones

Tabla 3.5. Fluorocromos. Longitudes de onda de absorción/emisión del FITC y del Texas Red y población celular identificada con ellos en el estudio.

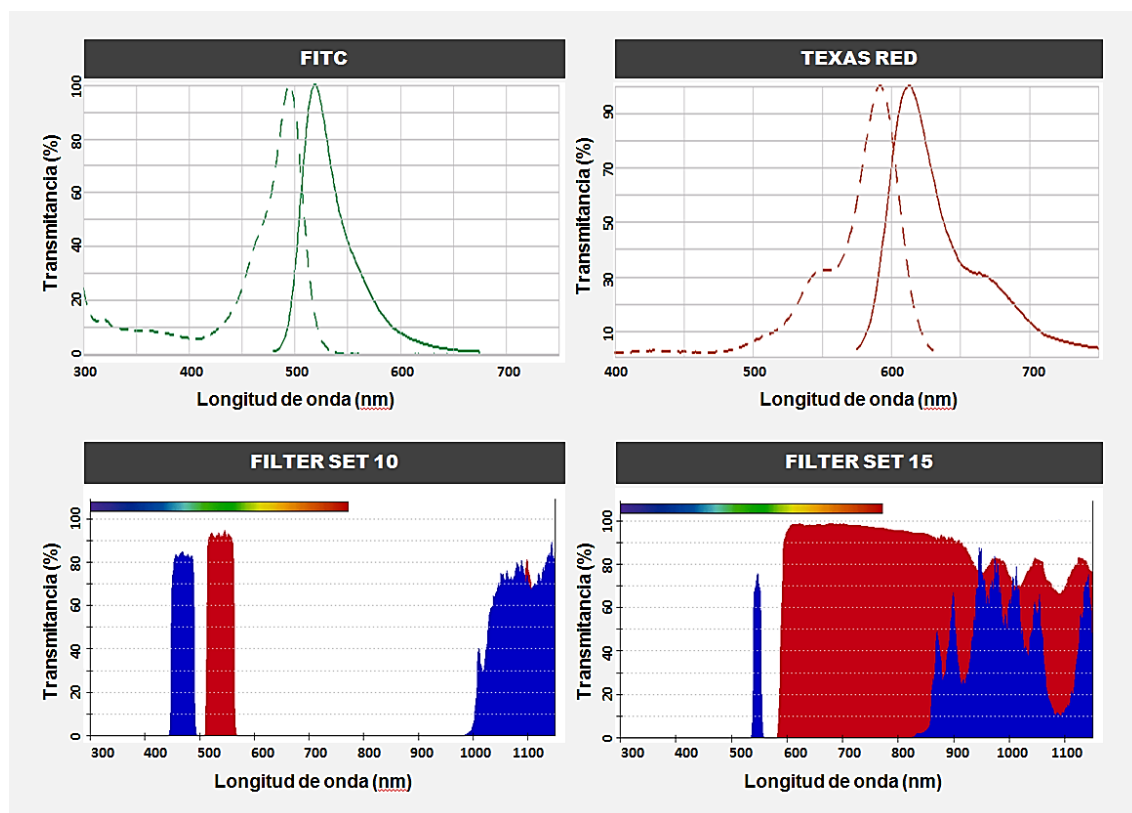


Figura 3.7. Fluorocromos y filtros. Espectros de absorción/emisión del FITC y del Texas Red y de los filtros del microscopio empleados para su detección.

3.4.1.2 Análisis de las células ganglionares de la retina NF-200+ y de los astrocitos GFAP+

Para analizar el efecto de la HTO en el tejido retiniano, se analizó cualitativamente la expresión NF-200+ y GFAP+. También se cuantificó de una manera completamente manual y enmascarada el número de somas de las CGRs NF-200+ y de astrocitos GFAP+ mediante microscopía óptica de fluorescencia en toda la muestra de estudio.

Para el **análisis y conteo de los somas de las CGRs NF-200+** se fotografió la extensión completa de la retina a lo largo de los ejes X-Y de forma monitorizada, evitándose de este modo posibles omisiones o duplicaciones de áreas retinianas en el conteo celular. Dado que las CGRs se disponían en diferentes planos a lo largo del eje Z, también se analizaron las retinas en este eje. Todas las imágenes se capturaron a una magnificación de 20x, que proporcionaba un campo de análisis de 0,1889mm². Sobre estas imágenes, se contabilizaron manualmente los somas de las CGRs NF-200+, haciendo uso de una

herramienta de conteo manual incluida en el software Metamorph Imaging System (Universal Imaging Corporation. EEUU), incorporado en el microscopio.

Para el **análisis cualitativo y el conteo de la población astrocitaria GFAP+**, se seleccionaron y fotografiaron sistemáticamente bajo las mismas condiciones de captura, 13 áreas de cada montaje plano de retina: una del disco óptico, tres de la zona superior, tres de la inferior, tres de la nasal y tres de la región temporal de la retina (Figura 3.8 A). Fueron excluidas las áreas de retina que presentasen ausencia o rotura del tejido en cualquier región del campo de imagen capturado. Las fotografías fueron tomadas a 10x, proporcionando un campo de análisis de 0,7850mm².

Los astrocitos de la retina de los ratones, podían distinguirse fácilmente unos de otros, lo que permitió su recuento de manera sencilla y fiable. Éstos fueron contabilizados en cada área fotografiada mediante el uso de la misma herramienta empleada en el conteo de las CGRs (Figura 3.8 B).

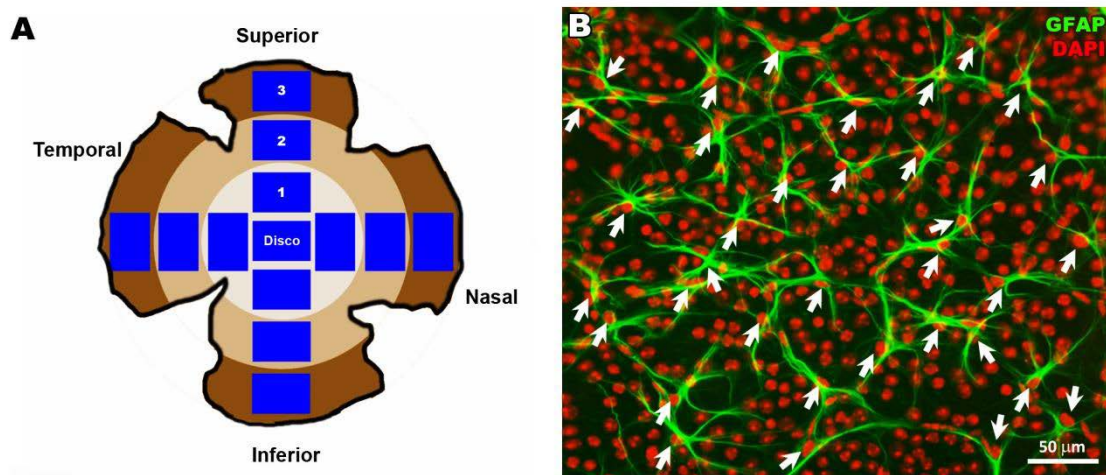


Figura 3.8. Análisis cuantitativo de los astrocitos GFAP+. A: esquema de un montaje plano de retina. Representación de las 13 áreas seleccionadas (azul) para la contabilización de los astrocitos GFAP+. B: inmunofluorescencia GFAP (verde) y DAPI (rojo). Montaje plano de retina. Imagen de cada área seleccionada donde se observan los núcleos celulares de la capa (rojo) y contabilizan los astrocitos GFAP+ (verde).

Con el fin de analizar una posible correlación entre las CGRs cuyos somas presentaban un inmunomarcaje NF-200+ y los astrocitos GFAP+, en las mismas áreas empleadas para el conteo astrocitario GFAP+, se contabilizaron también las CGRs NF-200+ (Figura 3.9).

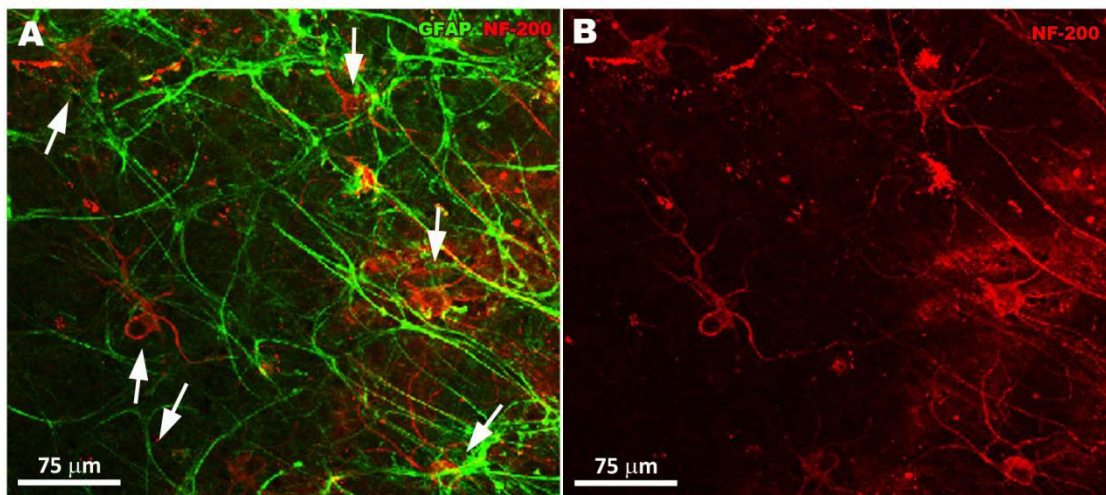


Figura 3.9. Inmunofluorescencia GFAP (verde) y NF-200 (rojo). Montaje plano de retina. A: imagen donde se observan los astrocitos GFAP+ y las CGRs NF-200+ (flecha). **B:** misma imagen que en A donde se observan de manera aislada las CGRs NF-200+.

3.4.1.3 Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+

En las mismas imágenes seleccionadas para el conteo de los astrocitos (a una magnificación de 10x), se cuantificó el área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ (AR-GFAP) (Figura 3.10 A).

Para ello, se utilizó la herramienta de segmentación de imágenes Threshold Tool del Metamorph Imaging System. En un primer paso el software umbralizaba las imágenes en función de una escala de grises. De esta manera se podían diferenciar y separar en cada imagen las zonas con intensidades altas (zonas GFAP+) de las zonas con intensidades bajas o nulas (fondo). Tras esta umbralización, el software seleccionaba las regiones imagen con altas intensidades y sobre ellas aplicaba una máscara de color rojo (Figura 3.10 B). Esta nueva imagen era una representación gráfica de las zonas que finalmente iban a ser analizadas por la herramienta Threshold Tool como el AR-GFAP.

Tras este análisis, el software devolvía un valor que representaba el área cuadrada GFAP+ de la imagen; conociendo este valor y sabiendo que el área de cada captura a 10x se correspondía con un área de 0,7850 mm², se podía obtener el porcentaje de la imagen ocupada por células GFAP+.

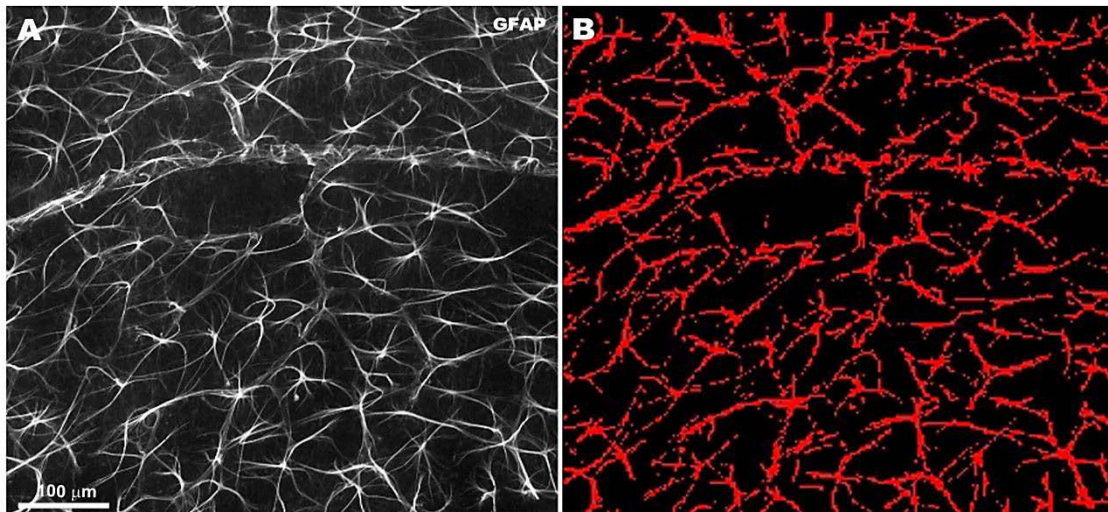


Figura 3.10. Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ (AR-GFAP). Montaje plano de retina. A: imagen donde se observan las células con una inmunofluorescencia GFAP+ (zonas brillantes) diferenciadas del fondo (zonas oscuras); **B:** misma imagen que en A tras la umbralización y la aplicación de la máscara de color por la herramienta Threshold Tool del Metamorph.

3.4.1.4 Intensidad de la inmunorreacción GFAP

Las mismas áreas seleccionadas para el conteo de astrocitos y la cuantificación del AR-GFAP, se utilizaron para analizar diferentes valores asociados a la intensidad de la inmunorreacción GFAP+ (**IR-GFAP**). Para ello, se empleó MATLAB[®] (MathWorks, EEUU) y el Metamorph Imaging System. MATLAB[®] es un lenguaje de computación usado en el desarrollo de algoritmos, visualización y análisis de datos y cálculo numérico, que puede utilizarse para el procesamiento de imágenes.

Sobre el AR-GFAP y empleando MATLAB[®], se crearon **mapas absolutos de pseudocolor** en base a una escala de grises que variaba entre 0-4095 niveles (imágenes de 12bits) permitiendo identificar las diferentes **intensidades de la IR-GFAP**. Todos estos mapas compartían una misma escala de colores, en la que cada valor de intensidad se correspondía con un color específico (Figura 3.11).

Con la ayuda de MATLAB[®] se determinó también la **intensidad media de la IR-GFAP** y el **porcentaje de AR-GFAP con intensidades de la IR-GFAP más elevadas** (píxeles con intensidades superiores a 3000 en la escala de grises) para analizar de manera exclusiva las regiones imagen con incrementos sustanciales de la IR-GFAP.

En los ojos con HTO, se cuantificó la **intensidad de cada astrocito GFAP+**. Para ello se empleó una herramienta manual incorporada en el Metamorph Imaging System, que ofrece información de los píxeles de la imagen (pixel-value information).

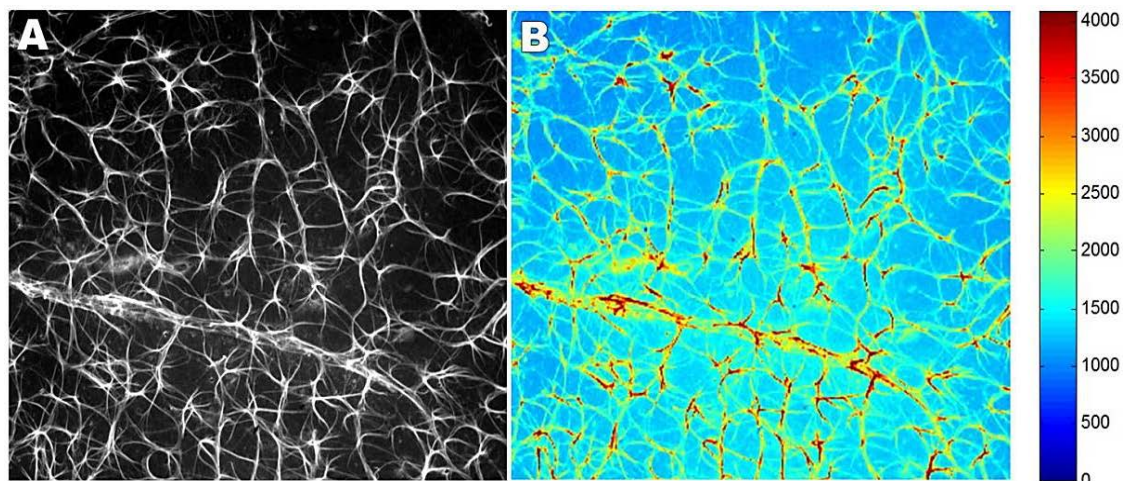


Figura 3.11. Intensidad de la inmunorreacción GFAP (IR-GFAP). Montaje plano de retina. A: imagen donde se observan las células con una inmunofluorescencia GFAP+ (zonas brillantes) diferenciadas del fondo (zonas oscuras); B: mapa absoluto de pseudocolor de la imagen A obtenido mediante MATLAB® que determina los diferentes niveles de la intensidad del AR-GFAP.

3.4.2 Caracterización de las células Iba-1+

3.4.2.1 Generalidades del análisis

Para caracterizar cualitativa y cuantitativamente las células Iba-1+ de la muestra, se realizaron inmunofluorescencias indirectas empleando como anticuerpo primario el rabbit anti-Iba-1 junto al Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit como anticuerpo secundario.

Las muestras fueron analizadas y fotografiadas empleando el dispositivo **ApoTome** (Carl Zeiss. Alemania) acoplado al microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania) equipado con el filtro adecuado que permite observar el espectro de emisión del Alexa Fluor 594 (Filter set 64. Carl Zeiss. Alemania). Todas las imágenes se capturaron con una cámara digital de alta resolución AxioCam HRm (Carl Zeiss. Alemania) acoplada al mismo microscopio (Tabla 3.6 y Figura 3.12).

Fluorocromo	Absorción	Emisión	Detección celular
Alexa Fluor 594	590 nm	617 nm	Células Iba-1+

Tabla 3.6. Fluorocromos. Longitudes de onda de absorción/emisión del Alexa Fluor 594 y población celular identificada con él en el estudio.

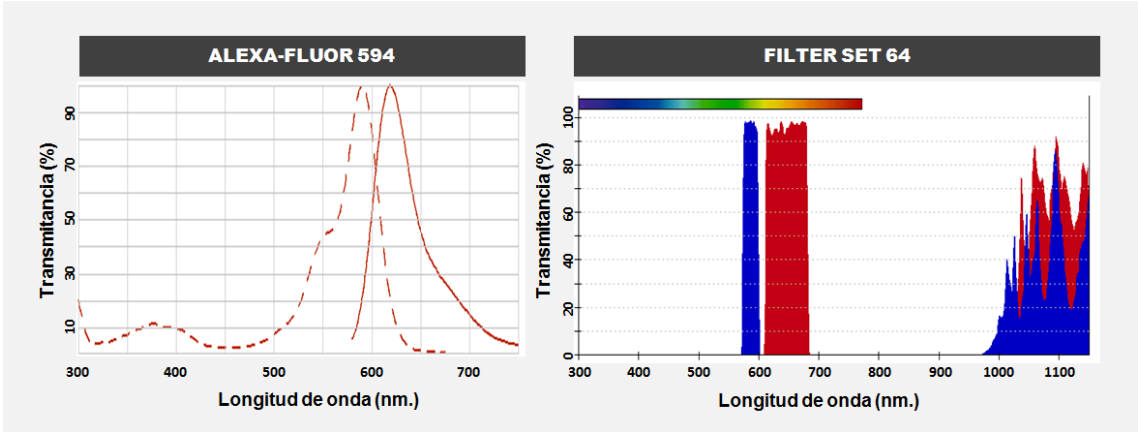


Figura 3.12. Fluorocromos y filtros. Espectros de absorción/emisión del Alexa Fluor 594 y del filtro del microscopio empleado para su detección.

Cuando se analiza una muestra bajo el microscopio, se distinguen claramente dos componentes en la imagen (Figura 3.13 A). Por un lado se observa una parte enfocada, que corresponde a la muestra que está dentro de la profundidad de campo del objetivo, y por otro, aparece un fondo borroso que pertenece a la muestra que está fuera del rango de enfoque. En la microscopía óptica de fluorescencia, la muestra fuera de foco interfiere de manera brusca con la información del plano de enfoque, y por tanto, compromete la calidad de la imagen final. Sin embargo, existen estrategias, como la desarrollada en ApoTome, que intentan paliar estos problemas.

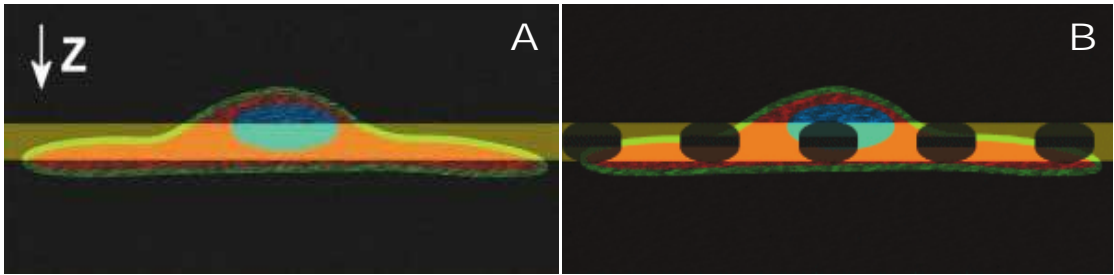


Figura 3.13. Microscopía óptica. A: iluminación convencional de la muestra en microscopía óptica; B: iluminación de la muestra en microscopía óptica junto con ApoTome.

El principio utilizado por **ApoTome** se fundamenta en la teoría de la interferometría y se conoce en la literatura como "grid projection" o "structured illumination". ApoTome proyecta una rejilla sobre el plano focal del objetivo que se desplaza hacia tres posiciones diferentes en la muestra (Figura 3.13 B y Figura 3.14). La imagen nítida que se forma de la rejilla, al igual que ocurre con la microscopía óptica convencional, está dentro de un rango de foco muy estrecho coincidente con la profundidad de campo del objetivo. Todo lo que se encuentre por debajo y por encima de este rango de enfoque estará fuera de foco y dará lugar a una imagen borrosa.

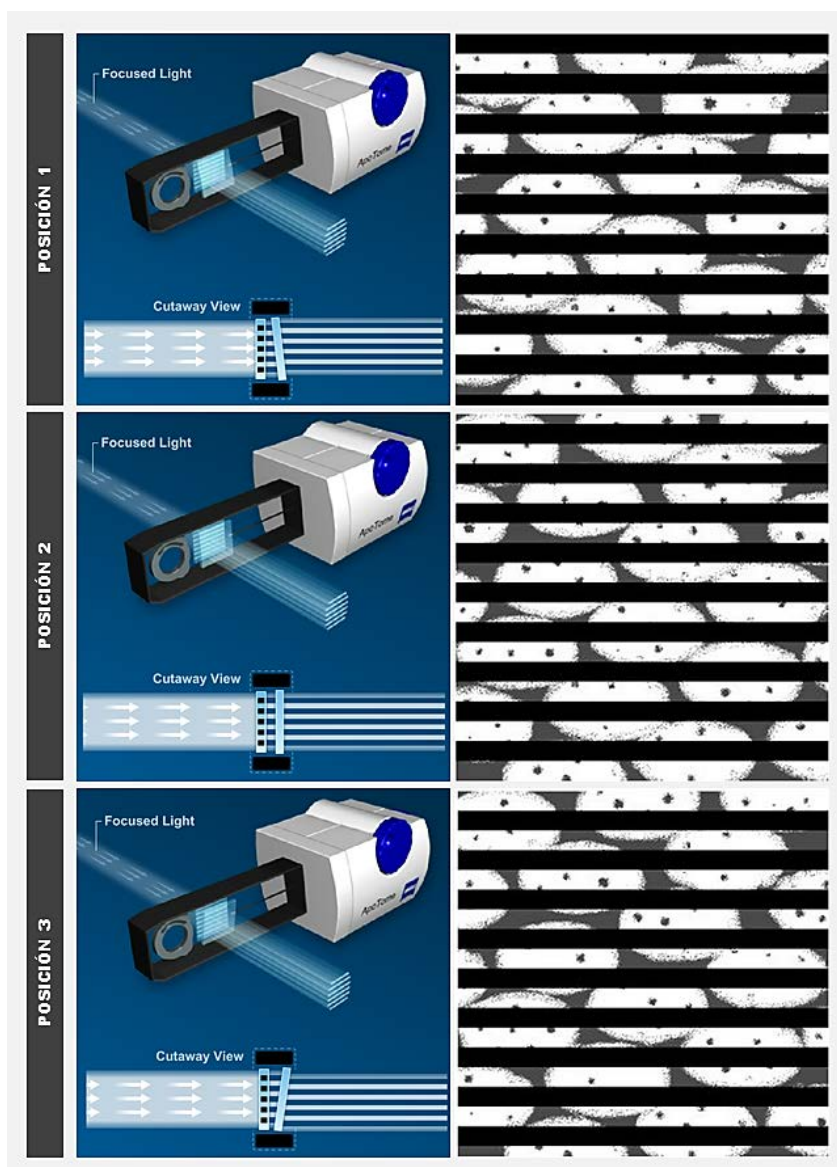


Figura 3.14. Microscopía óptica con ApoTome. Proyección de la rejilla de ApoTome, sobre la muestra en tres posiciones espaciales diferentes en el plano de enfoque. [Modificadas de: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/opticalsectioning/apotome/indexflash.html>].

Una cámara CCD (charge-coupled device) se encarga de tomar una foto en cada una de las tres posiciones para finalmente combinarlas de manera computarizada. En las tres posiciones en las que se proyecta la red, los datos de todas ellas fuera de foco (en niveles de grises) son idénticos. De esta forma, el algoritmo utilizado por ApoTome identifica y posteriormente elimina las regiones comunes en las tres imágenes capturadas, dejando exclusivamente la imagen del plano focal. La imagen resultante se asemeja a una sección óptica de la muestra en el plano de enfoque, la cual está libre de toda la información que está fuera de foco en el momento de la captura. El resultado del proceso es una imagen con un contraste y una resolución mejorada gracias a la optimización de la relación señal-ruido de la muestra (Figura 3.15).

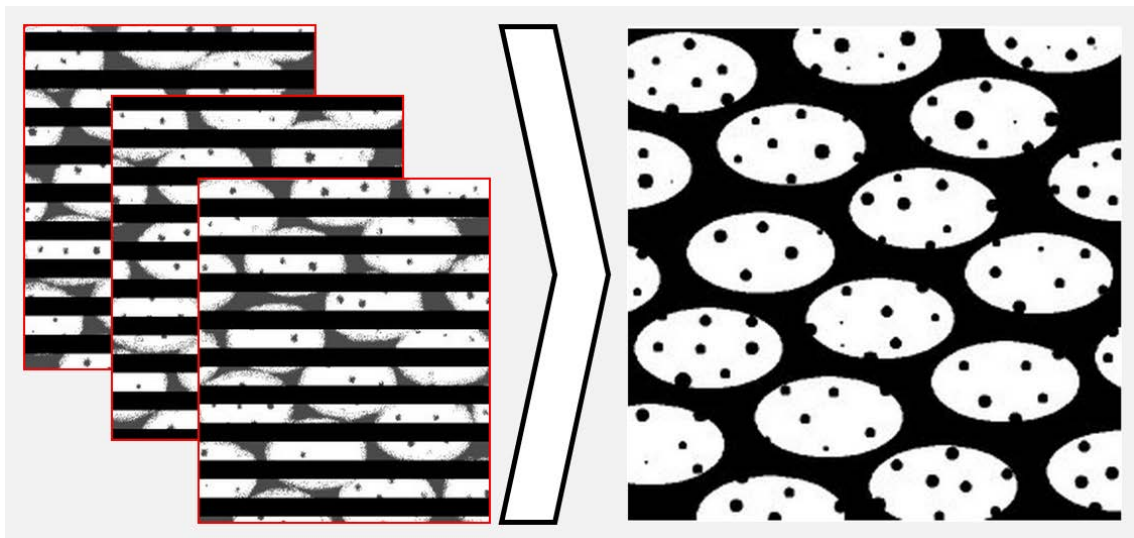


Figura 3.15. Microscopía óptica de fluorescencia con ApoTome. El resultado de la combinación de tres imágenes de la proyección de la red e imagen final de la muestra con mejoras del contraste y la resolución gracias a la optimización imagen mediante el algoritmo usado por ApoTome.

Para el análisis cuantitativo de las células Iba-1+, se fotografiaron todos y cada uno de los campos imagen contenidos en el meridiano horizontal y en el meridiano vertical que cruzaban el disco óptico, sin considerar éste como muestra de análisis. Debido a que estas células se encuentran en diferentes niveles a lo largo del eje Z, se analizó sistemáticamente toda la retina en este eje. Todas las imágenes seleccionadas se capturaron garantizando que ninguna parte del tejido contiguo se omitiese o se duplicase. De igual manera, se excluyeron aquellas áreas en las que existía ausencia o rotura del tejido.

Las fotografías fueron tomadas a 20x, proporcionando un área de análisis final de 0,1502 mm² (Figura 3.16).

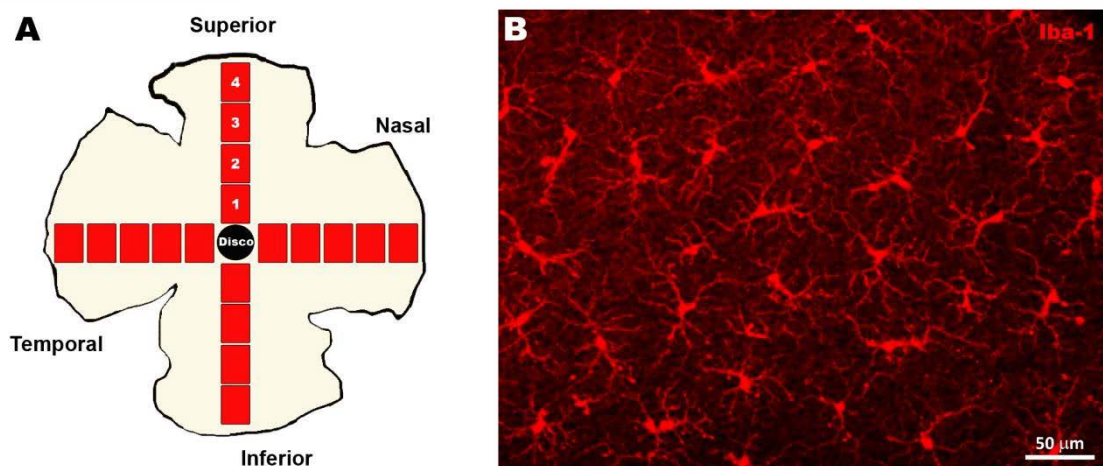


Figura 3.16. Análisis cuantitativo de las células Iba-1+. Montaje plano de retina. A: esquema de un montaje plano de retina. Varias áreas (rojo) son seleccionadas para el conteo de las células Iba-1+. **B: inmunofluorescencia Iba-1 (rojo). Montaje plano de retina.** Imagen de cada área seleccionada para el conteo de las células Iba-1+.

3.4.2.2 Análisis de las células Iba-1+: morfología, número y área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+

Sobre las imágenes recogidas, se llevó a cabo un **análisis cualitativo y cuantitativo de la población Iba-1+** en cada capa retiniana con presencia de células Iba-1+.

Considerando el alto número de muestras a estudio, fue necesario automatizar el proceso de conteo celular. Sin embargo, dada la complejidad morfológica de la población Iba-1+, realizar el conteo celular mediante algunos algoritmos ya existentes en programas de procesamiento de imágenes como Metamorph o ImageJ entre otros, resultó ser un proceso poco eficiente. Por ambas razones, se implementó un **nuevo algoritmo bajo el entorno MATLAB®**, que permitió por un lado llevar a cabo el conteo celular y por otro determinar el área total de inmunomarcaje Iba-1+ mediante la umbralización de la imagen, ambas tareas de manera automatizada.

El algoritmo se desarrolló en diferentes pasos hasta conseguir la caracterización final de la imagen, teniendo en cuenta ciertas particularidades de las células Iba-1+. Entre

ellas, se asumió que las células tenían un soma del que emergían múltiples prolongaciones y que estas células estaban dispuestas a lo largo de la retina formando un mosaico celular sin existir solapamientos entre ellas. La Figura 3.17 muestra un esquema de las principales operaciones que realizaba el algoritmo para la localización y el conteo de las células Iba-1+.

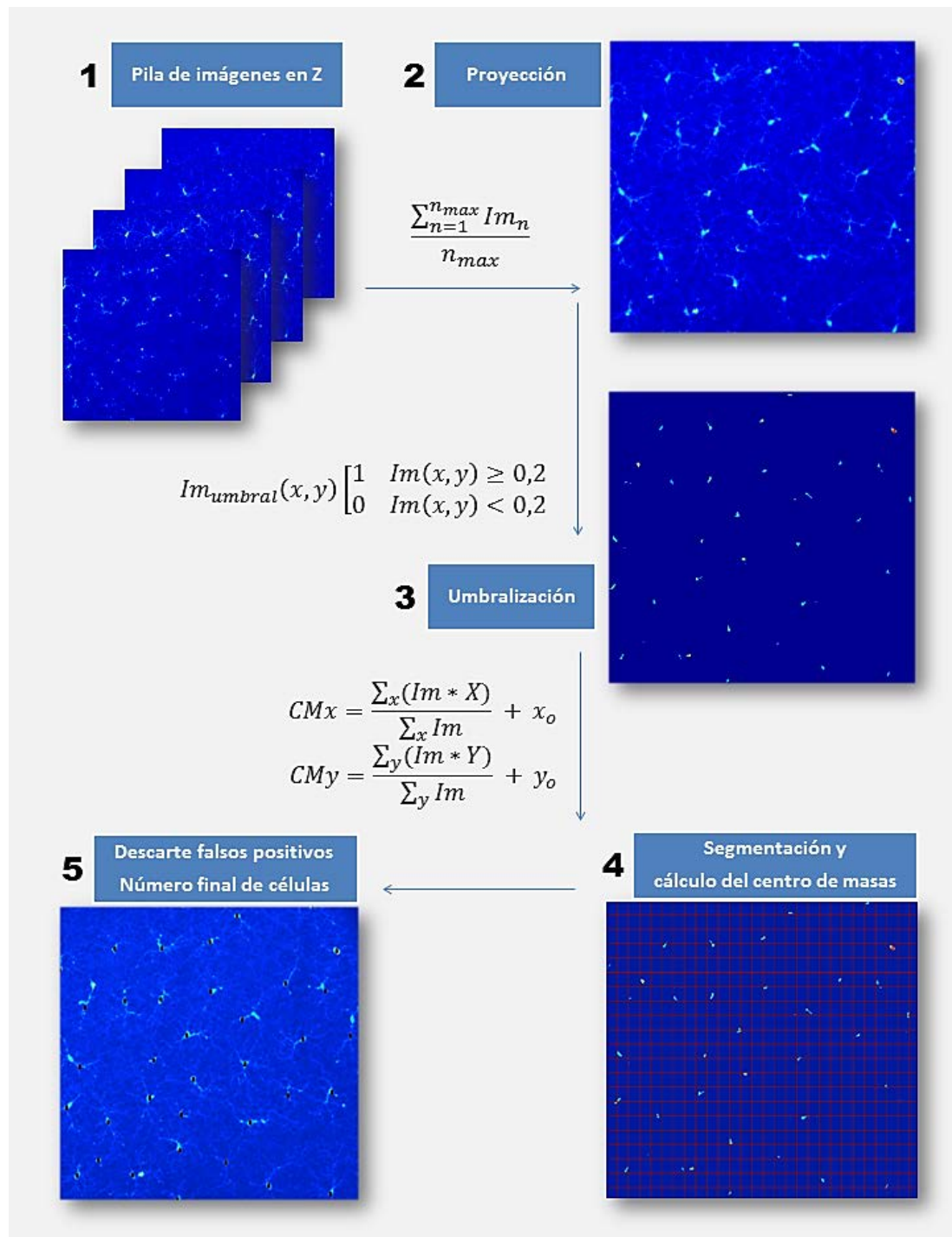


Figura 3.17. Contaje automático de las células Iba-1+: algoritmo en MATLAB®. Esquema gráfico y matemático del procedimiento del algoritmo para la localización y el conteo de las células Iba-1+.

En líneas generales, las operaciones realizadas por el algoritmo empleado fueron:

a. Obtención de la proyección de los diferentes planos capturados en el eje Z

Con el microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania) se capturaron imágenes seriadas de la retina de dimensiones 448x336 μm sobre el plano X-Y, a lo largo del eje Z cada 2,0 μm de profundidad. A su vez y de forma manual, cada pila general de imágenes se segregó en subgrupos, que se correspondían con las diferentes capas retinianas con presencia de células Iba-1+. Posteriormente y de acuerdo a la Ecuación 3.1, se promedió cada bloque de imágenes de manera automatizada mediante nuestro algoritmo. El resultado de esta operación fue la proyección de todas las imágenes seleccionadas en una nueva, la cual contenía la información de todos los planos proyectados pero con un mayor contraste que el de las imágenes individuales.

$$\text{Proyección} = \frac{\sum_{n=1}^{n_{\max}} Im_n}{n_{\max}} \quad (3.1)$$

b. Umbralización

Dado que el valor máximo de las distintas imágenes de proyección oscilaba, para facilitar el procesamiento posterior, éstas fueron normalizadas por su máximo, es decir, las intensidades de la imagen final oscilaban entre cero y uno. A continuación se aplicó un nivel de umbralización de 0,2 (Ecuación 3.2). Esto significa que, todos aquellos píxeles de la imagen con un valor mayor o igual a 0,2 tomaron el valor 1 (señal), y el resto de ellos el valor 0 (fondo). De esta forma se obtuvo una nueva imagen, en función de unos y ceros, en la que quedaban representados exclusivamente aquellos píxeles que tomaban un valor no nulo, o lo que es lo mismo, las zonas de la imagen donde aparecía una clara inmunorreactividad Iba-1+.

$$Im_{\text{umbral}}(x, y) \begin{cases} 1 & Im(x, y) \geq 0,2 \\ 0 & Im(x, y) < 0,2 \end{cases} \quad (3.2)$$

c. Segmentación

Posteriormente, las imágenes de tamaño 1388x1040 píxeles se dividieron en regiones cuadradas de 50 píxeles de lado, quedando finalmente éstas seccionadas en un total de 588 cuadrantes. Teniendo en cuenta la densidad media y la distribución de las células Iba-1+ en cada imagen, esta segmentación garantizaba que dos células nunca estuvieran presentes dentro de un mismo cuadrante imagen.

d. Cálculo del centro de masas

A continuación, de cada uno de los 588 cuadrantes se calculó el centro de masas en las coordenadas X e Y según las Ecuaciones 3.3 y 3.4, donde Im son los valores de intensidad media del cuadrante analizado y X e Y son sus posiciones en el eje X e Y respectivamente.

$$\text{Centro de Masas } x = \frac{\sum_x (Im * X)}{\sum_x Im} + x_o \quad (3.3)$$

$$\text{Centro de Masas } y = \frac{\sum_y (Im * Y)}{\sum_y Im} + y_o \quad (3.4)$$

Si en un cuadrante todos los valores eran nulos ($Im = 0$), se consideraba que no existía presencia celular. Si por el contrario existían valores diferentes del valor nulo ($Im \neq 0$), el cálculo del centro de masas identificaba la posible posición celular dentro del cuadrante.

e. Detección de falsos positivos: descarte de puntos extra

Aunque no se esperaba encontrar dos o más células en un mismo cuadrante tras la segmentación de la imagen, sin embargo, podía ocurrir que una misma célula ocupase dos o más cuadrantes contiguos dando lugar a un error de conteo (Figura 3.18).

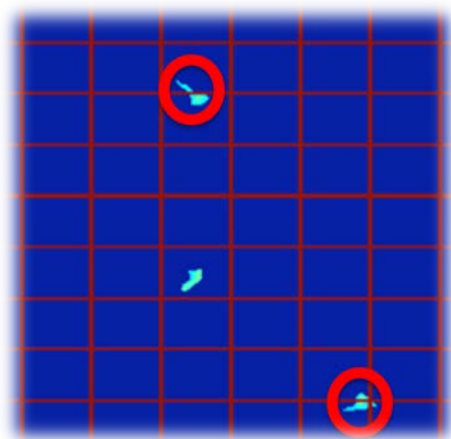


Figura 3.18. Detección de falsos positivos: descarte de puntos extra. Imagen donde se observa la presencia de dos células (círculos rojos) ocupando más de un cuadrante.

Sin embargo, un screening de la población celular Iba-1+ previo al desarrollo del algoritmo, sumado a que estas células no se solapaban entre sí, permitió establecer una condición de restricción de distancia mínima entre dos células. En el caso de las retinas de los animales control y en los contralaterales esta distancia mínima era de aproximadamente 100 píxeles, siendo de 80 en los ojos-HTO, esto último debido a la presencia de un mayor número de células. Es decir, si el centro de masas de dos cuadrantes se encontraba a una distancia menor a la de restricción, éstos eran considerados como una única célula.

f. Interfaz gráfica de usuario y desarrollo de un algoritmo de búsqueda recurrente

El algoritmo completo fue incluido dentro de una interfaz gráfica de usuario que simplificaba su uso a usuarios poco duchos en el manejo de MATLAB[®]. A su vez se introdujo un algoritmo de búsqueda recurrente de carpetas, que permitió realizar el conteo de la totalidad de los datos de una forma automática. La interfaz gráfica de usuario se muestra en la Figura 3.19.

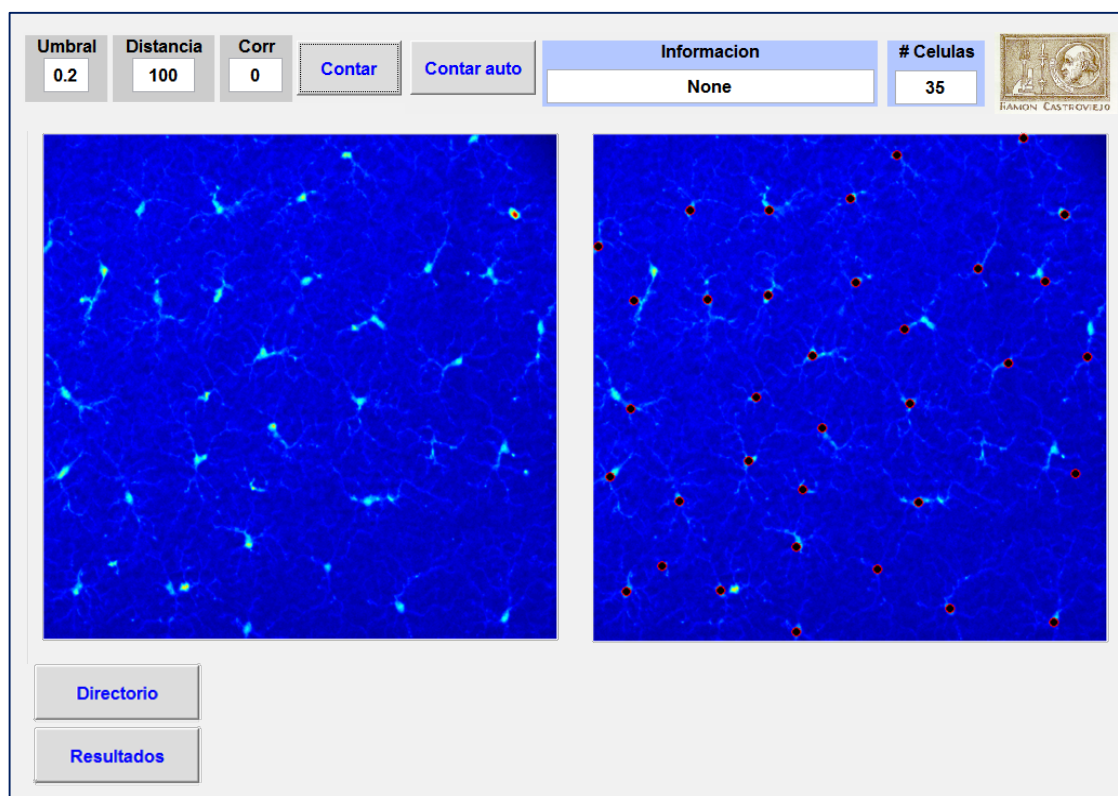


Figura 3.19. Interfaz gráfica del algoritmo de conteo de las células Iba-1+. La interfaz posee diferentes cuadros de texto donde determinar las condiciones de “*umbral*” o de “*distancia*” en el análisis, obtener información de la imagen analizada o del número de células contabilizadas. El botón “*contar*” inicia el conteo celular en imágenes seleccionadas manualmente y “*contar auto*” lo hace en múltiples imágenes mediante una búsqueda recurrente en carpetas.

g. Validación del método de conteo automatizado

Antes de emplear como herramienta habitual de trabajo el algoritmo desarrollado en MATLAB[®] para el conteo automatizado de las células Iba-1+, fue necesaria su validación. Para ello se seleccionaron aleatoriamente 20 imágenes de la CPI y otras 20 de la CPE en grupo control, y lo mismo para los ojos contralaterales y los ojos-HTO. En ellas se llevó a cabo un conteo manual y otro automático.

Además de la posibilidad del conteo automático celular, el algoritmo poseía otra herramienta denominada “*umbral*”, mediante la cual se podía determinar de forma semiautomática el **área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+ (AR-Iba1)**.

Para ello, y al igual que en el algoritmo de conteo, en un primer paso se aplicó un nivel de umbralización variable en cada imagen en función de una escala de grises. De esta

forma en cada una de ellas se podían reconocer y separar las zonas con intensidades altas (zonas Iba-1+) de las zonas con intensidades bajas o nulas (fondo). Tras esta umbralización, el algoritmo seleccionaba las regiones imagen con altas intensidades Iba-1+ y gráficamente las mostraba en una nueva imagen, la cual era una representación visual de las zonas analizadas finalmente (Figura 3.20).

Tras este análisis, el algoritmo devolvía un valor que representaba el porcentaje del AR-Iba1 respecto al área total de la imagen. Partiendo de este valor y teniendo en cuenta que cada imagen capturada a 20X mediante ApoTome se correspondía con un área de 150208,63 μm^2 , se podía calcular posteriormente el valor del área cuadrada.

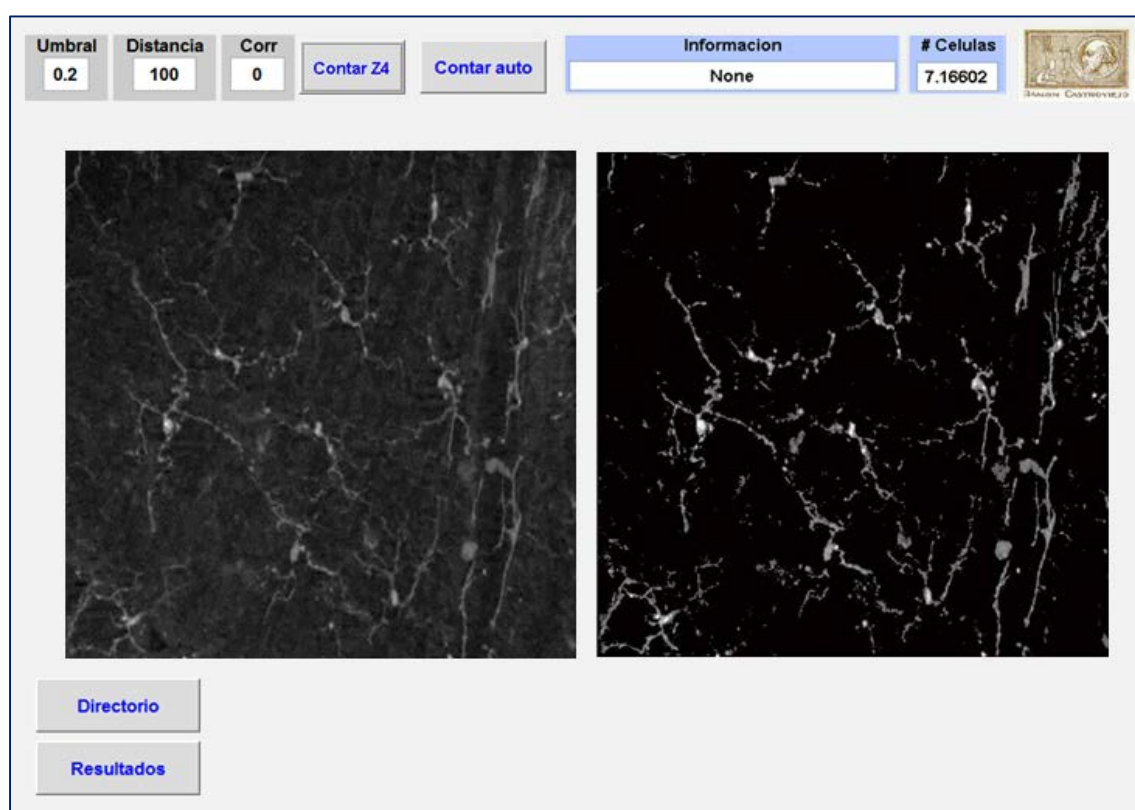


Figura 3.20. Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+ (AR-Iba1). La imagen izquierda muestra las células Iba-1+ de la CFN-CCG de la retina, (zonas brillantes) diferenciadas del fondo imagen (zonas oscuras); a la derecha, se observa la umbralización de dicha imagen donde gráficamente se representa el área analizada (zonas brillantes) mediante la herramienta “umbral” del algoritmo desarrollado en MATLAB®.

El análisis cuantitativo de las células Iba-1+ se llevó a cabo mediante diferentes maniobras, automáticas y/o manuales, en función del estrato retiniano analizado. Gracias

al algoritmo desarrollado en MATLAB[®], de manera completamente automatizada se realizó un conteo del número de células en la CPI y en la CPE; mediante la herramienta semiautomática “umbral” se realizó un análisis cuantitativo del AR-Iba1 en la CFN-CCG. Y por último, dadas las características de la CFR, en ella se cuantificó la población celular Iba-1+ mediante una maniobra manual.

3.4.2.3 Dominios espaciales retinianos de las células Iba-1+

Se analizó el **dominio espacial retiniano de cada célula Iba-1+**, entendiéndose como tal el área determinada por la unión de los puntos más distales de todas las prolongaciones celulares sobre los ejes X-Y-Z (3D). Este análisis por tanto se llevó a cabo sobre la imagen de proyección, resultante de la suma de una serie de imágenes sobre el eje Z. Esta caracterización se llevó a cabo en la CPI y la CPE, debido a la distribución en forma de mosaico que tenían las células Iba-1+ en ellas.

Se analizaron sistemáticamente 4 áreas equivalentes de cada montaje plano en cada capa retiniana de estudio. Con la finalidad de no sesgar los resultados en función de la excentricidad y/o la localización sectorial en la retina, las áreas analizadas se tomaron a diferentes distancias del disco óptico y de los diferentes cuadrantes de la retina. Así, se seleccionó de la retina superior el área más próxima al disco óptico, de la zona inferior el área que ocupaba dos niveles de excentricidad desde el disco óptico, del cuadrante nasal el área que ocupaba tres niveles de excentricidad y de la temporal el área alejada del disco óptico cuatro niveles de excentricidad (Figura 3.21).

Este análisis se realizó empleando la herramienta de medida Interactive Measurement del programa AxioVision (Carl Zeiss. Alemania) asociado al microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania). Con ella, la unión manual de los puntos más distales de las prolongaciones de las células Iba-1+ ofrecía el valor del área (μm^2) que ocupaba cada una de estas células (Figura 3.22). Este análisis se limitó sólo a aquellas células Iba-1+ que estuviesen contenidas en su totalidad dentro del campo imagen.

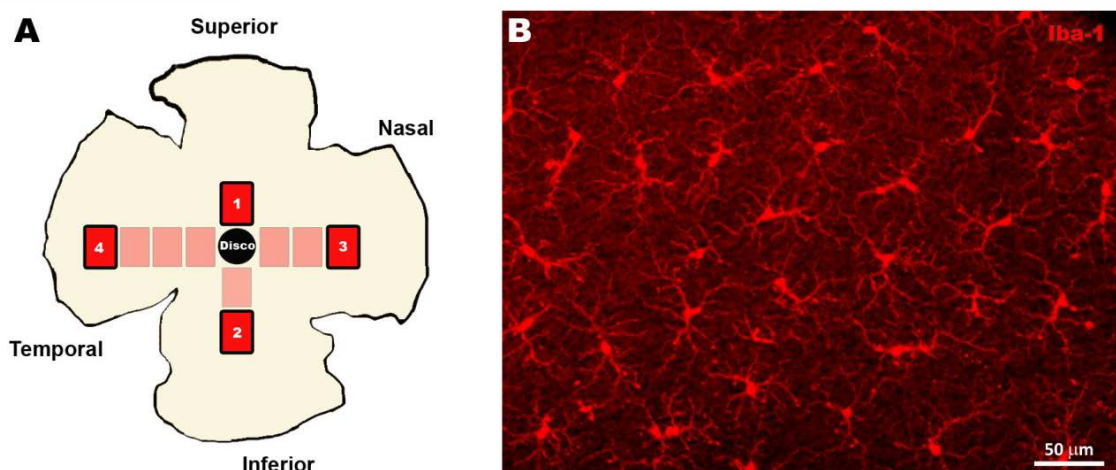


Figura 3.21. Análisis cuantitativo del dominio espacial retiniano de las células Iba-1+. Montaje plano de retina. A: esquema de un montaje plano de retina. Varias áreas (rojo: 1, 2, 3, 4) son seleccionadas para el análisis del dominio espacial retiniano de las células Iba-1+. **B: inmunofluorescencia Iba-1 (rojo). Montaje plano de retina.** Imagen de la CPE para el análisis del dominio espacial retiniano de las células Iba-1+.

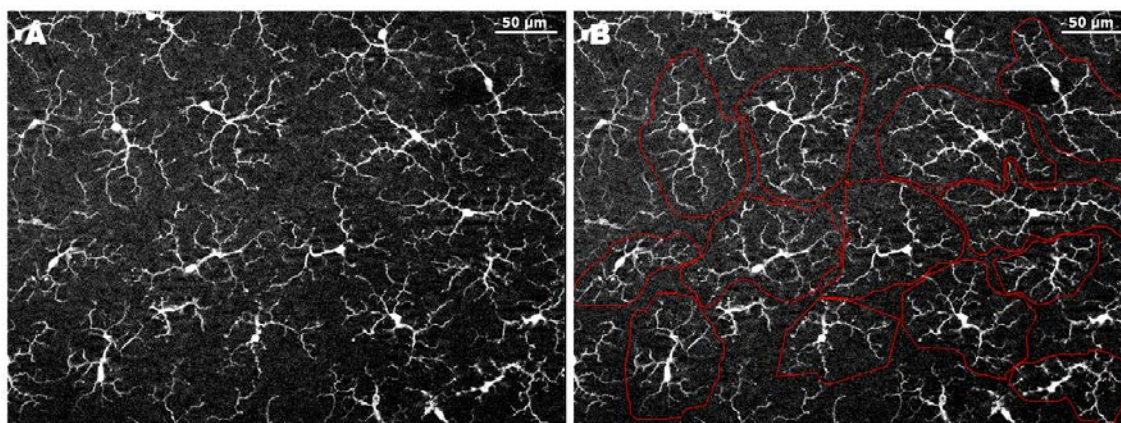


Figura 3.22. Análisis cuantitativo del dominio espacial retiniano de las células Iba-1+. Montaje plano de retina. A: imagen de la CPE donde se aprecian las células Iba-1+. **B:** misma imagen que en A en la que se observa el marcaje manual del perímetro (línea roja) de cada célula Iba-1+.

3.4.2.4 Expresión del CD68 en las células Iba-1+

Para la realización de esta parte del estudio se llevaron a cabo inmunomarcajes dobles empleando como anticuerpos primarios el rabbit anti-Iba-1 y el rat anti-mouse CD68. Se emplearon como anticuerpos secundarios respectivamente el Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit y el Alexa Fluor 488 goat anti-rat.

Nuevamente, las muestras se analizaron y fotografiaron empleando el dispositivo **ApoTome** acoplado al microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania), utilizando los filtros que permitían observar el espectro de emisión del Alexa Fluor 594, descrito previamente, (Filter set 64. Carl Zeiss. Alemania) para el análisis de las células Iba-1+ y del Alexa Fluor 488 (Filter set 17. Carl Zeiss. Alemania) para el estudio del inmunomarcaje CD68+.

Se analizó la extensión completa de la retina a lo largo de los ejes X-Y-Z y se capturaron imágenes a diferentes magnificaciones con la cámara digital de alta resolución AxioCam HRm (Carl Zeiss. Alemania) acoplada al mismo microscopio (Tabla 3.7 y Figura 3.23).

Fluorocromo	Absorción	Emisión	Detección celular
Alexa Fluor 594	590 nm	617 nm	Células Iba-1+
Alexa Fluor 488	496 nm	519 nm	Células CD68+

Tabla 3.7. Fluorocromos. Longitudes de onda de absorción/emisión del Alexa Fluor 594, del Alexa Fluor 488 y población celulares identificadas con ellos en el estudio.

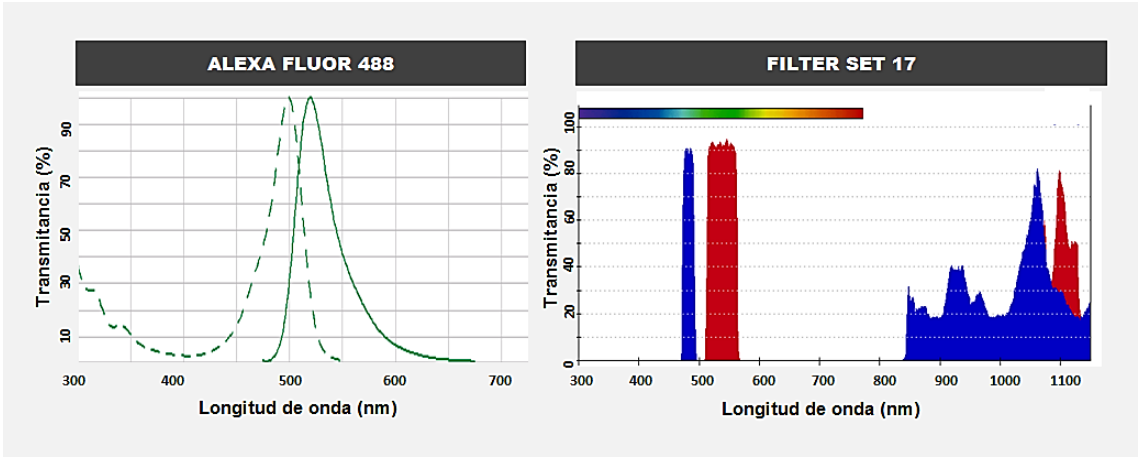


Figura 3.23. Fluorocromo y filtro. Espectro de absorción/emisión del Alexa Fluor 488 y del filtro del microscopio empleado para su detección.

3.4.3 Expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) en la glía retiniana

Para la caracterización cualitativa de las células gliales de la retina MHC-II+, se realizaron inmunofluorescencias triples indirectas usando como anticuerpos primarios el rabbit anti-Iba-1, el chicken anti-GFAP y el rat anti-mouse MHC-II, unidos a los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit, DyLight 405 donkey anti-chicken y Alexa Fluor 488 goat anti-rat respectivamente.

Las muestras fueron analizadas y fotografiadas empleando el dispositivo **ApoTome** acoplado al microscopio óptico de fluorescencia Axioplan 2 Imaging Microscope (Carl Zeiss. Alemania). Mediante los filtros adecuados (algunos ya descritos previamente) se pudo observar el espectro de emisión del Alexa Fluor 594 (Filter set 64. Carl Zeiss. Alemania) para el estudio de la población Iba-1+, del DyLight 405 (Filter set 49. Carl Zeiss. Alemania) para la detección de la población macroglial GFAP+ y del Alexa Fluor 488 (Filter set 17. Carl Zeiss. Alemania) para el estudio de la inmunorreacción MHC-II+.

Se analizó la extensión completa de la retina a lo largo de los ejes X-Y-Z y se capturaron imágenes a diferentes magnificaciones con la cámara digital de alta resolución AxioCam HRm (Carl Zeiss. Alemania) acoplada al microscopio óptico de fluorescencia (Tabla 3.8 y Figura 3.24).

Fluorocromo	Absorción	Emisión	Detección celular
Alexa Fluor 594	590 nm	617 nm	Células Iba-1+
DyLight 405	400 nm	421 nm	Astrocitos y células de Müller
Alexa Fluor 488	496 nm	519 nm	Células MHC-II+

Tabla 3.8. Fluorocromos. Longitudes de onda de absorción/emisión del Alexa Fluor 594, del DyLight 405 y del Alexa Fluor 488. Población celulares identificadas con ellos en el estudio.

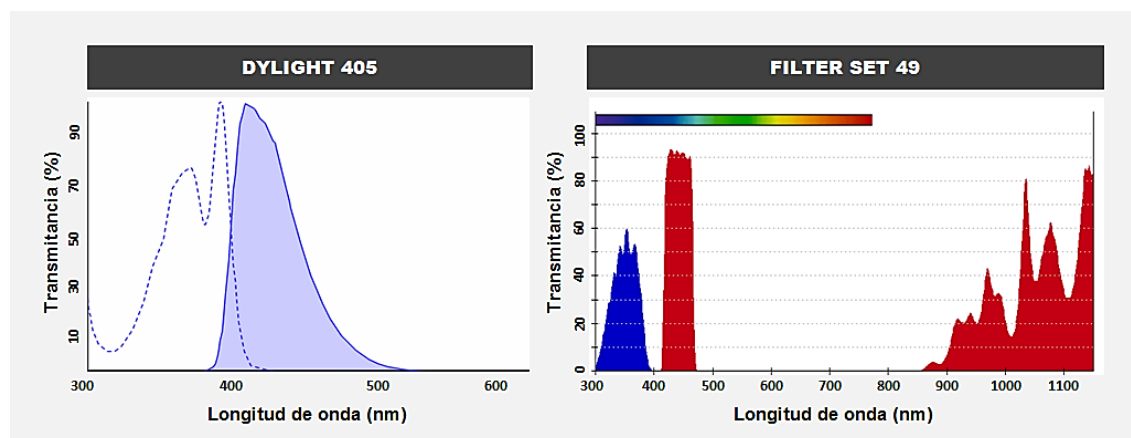


Figura 3.24. Fluorocromo y filtro. Espectro de absorción/emisión del DyLight 405 y del filtro del microscopio empleado para su detección.

3.5 Análisis estadístico de la muestra

Todos los datos obtenidos del análisis de la muestra quedaron registrados en hojas de cálculo Excel para Windows® (Microsoft®; Redmond, WA, EEUU) y posteriormente fueron analizados mediante el programa estadístico SPSS® 19.0 para Windows® (IBM®, Armonk, NY, EEUU).

Se obtuvieron los valores promedios de todas las variables a estudio junto con sus correspondientes desviaciones típicas, que aparecen reflejados en los resultados como (media \pm desviación típica). Se llevaron a cabo diferentes contrastes de hipótesis de la muestra, que compararon, en líneas generales, los datos de los:

Ojos del grupo control de edad	VS	Ojos contralaterales
		VS
		Ojos-HTO

Tabla 3.9. Estudio estadísticos de la muestra. Contrastes de hipótesis diseñados para el análisis de los datos recogidos en el estudio.

Comprobada la normalidad de las variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, para el contraste de dos variables cuantitativas se realizó el test de la **t de Student** para muestras dependientes o independientes. Se estableció un P-valor de

significación estadística igual o menor a 0,05. Dado que durante el análisis de la muestra el P-valor mostró diferentes niveles de significación, según acuerdo:

*	P<0,05
**	P<0,01
***	P<0,001

Tabla 3.10. Significación estadística. Equivalencias entre los p-valores y las gráficas empleadas en el estudio para diferenciar los distintos niveles de significación estadística.

Resultados

4 Resultados

4.1 Inducción de la hipertensión ocular

En las **primeras 24 horas** (Figura 4.1) tras la fotocoagulación láser se produjo un incremento de la PIO en los ojos-HTO ($31,7 \pm 7,7$ mmHg), que llegaba casi a duplicar los valores basales ($16,1 \pm 2,1$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t pareada).

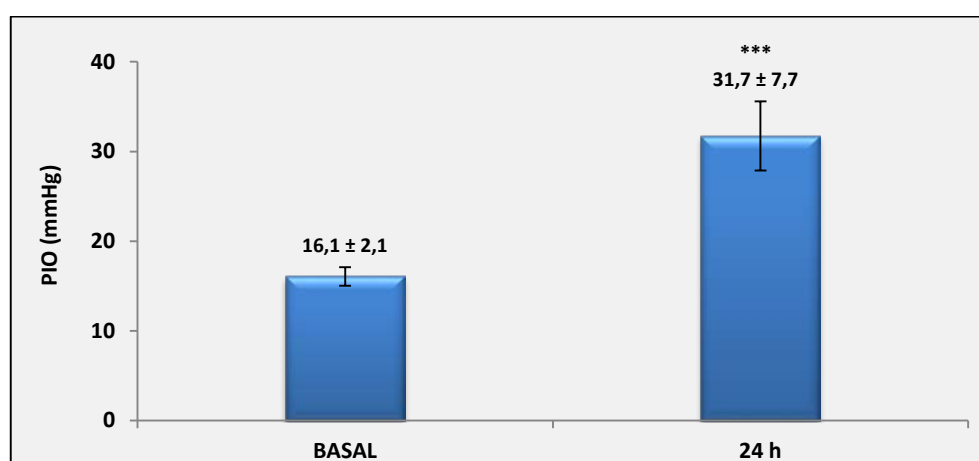


Figura 4.1. Primeras 24 h. PIO: valores medios y desviación estándar. Registros basales y a las 24 h de la fotocoagulación láser en los ojos-HTO.

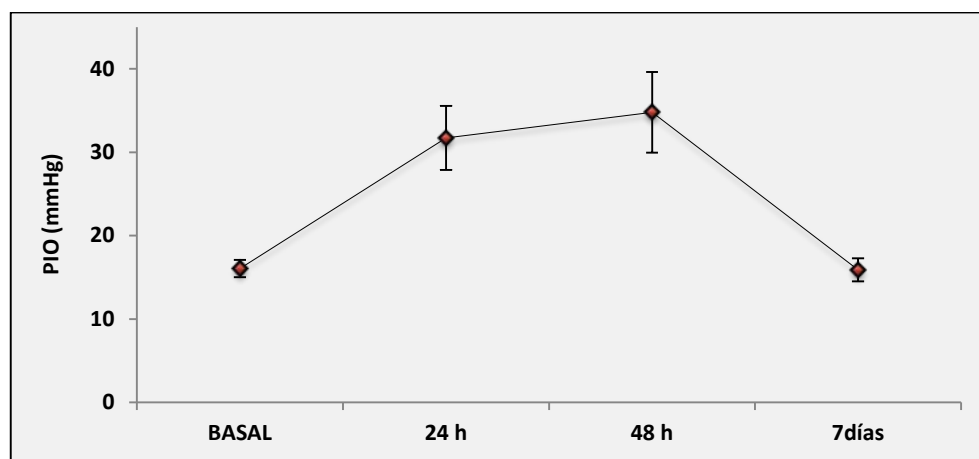


Figura 4.2. Una semana de HTO. Perfil de la PIO en los ojos-HTO tras la fotocoagulación láser.

En el intervalo comprendido entre las 24-48h tras el tratamiento láser se alcanzaron los valores máximos de PIO. Después la PIO descendía progresivamente para recuperar

niveles similares a los basales a la semana del tratamiento (Figura 4.2). Este patrón se repetía de forma similar en todos los animales de la muestra.

Los **valores medios de PIO** en los ojos-HTO ($27,9 \pm 3,9$ mmHg) diferían de los registrados en los animales control ($15,8 \pm 2,2$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) y en los ojos contralaterales ($15,6 \pm 1,0$ mmHg) ($P < 0,001$, prueba-t pareada). La PIO de los animales del grupo control y de los ojos contralaterales estaba dentro de niveles normales y no se observaban diferencias entre los valores de ambos ojos (Figura 4.3).

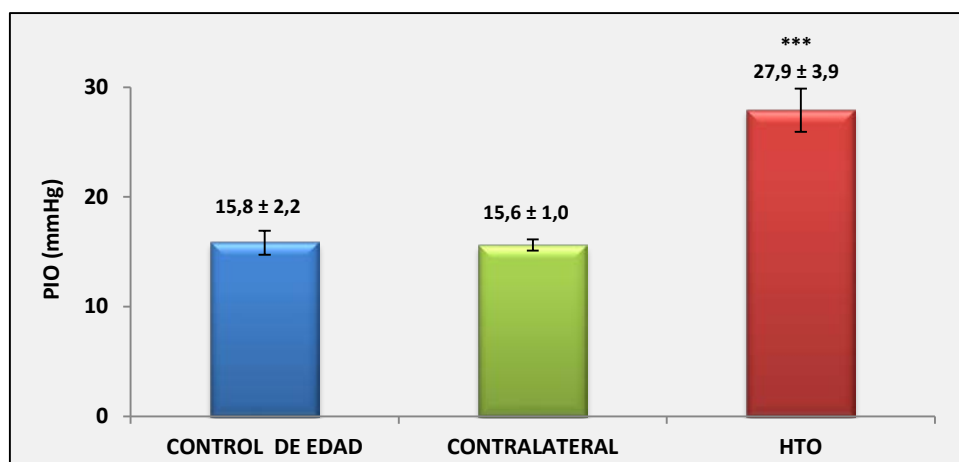


Figura 4.3. PIO de los ojos de estudio. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

4.2 Efecto de la hipertensión ocular en las células ganglionares de la retina NF-200+

4.2.1 Análisis morfológico y cuantitativo de las células ganglionares de la retina NF-200+

4.2.1.1 Grupo control de edad y ojos contralaterales no tratados

En los ojos del grupo control y en los ojos contralaterales, se observaba un inmunomarcaje NF-200+ homogéneo en los **axones de las CGRs**. Éstos tenían una morfología rectilínea y discurrían de manera radial, paralelos entre sí, desde la zona de entrada del nervio óptico hasta la región más periférica de la retina (Figura 4.4 A-D). La densidad de axones NF-200+ era cualitativamente mayor en la retina central y disminuía hacia las regiones más periféricas.

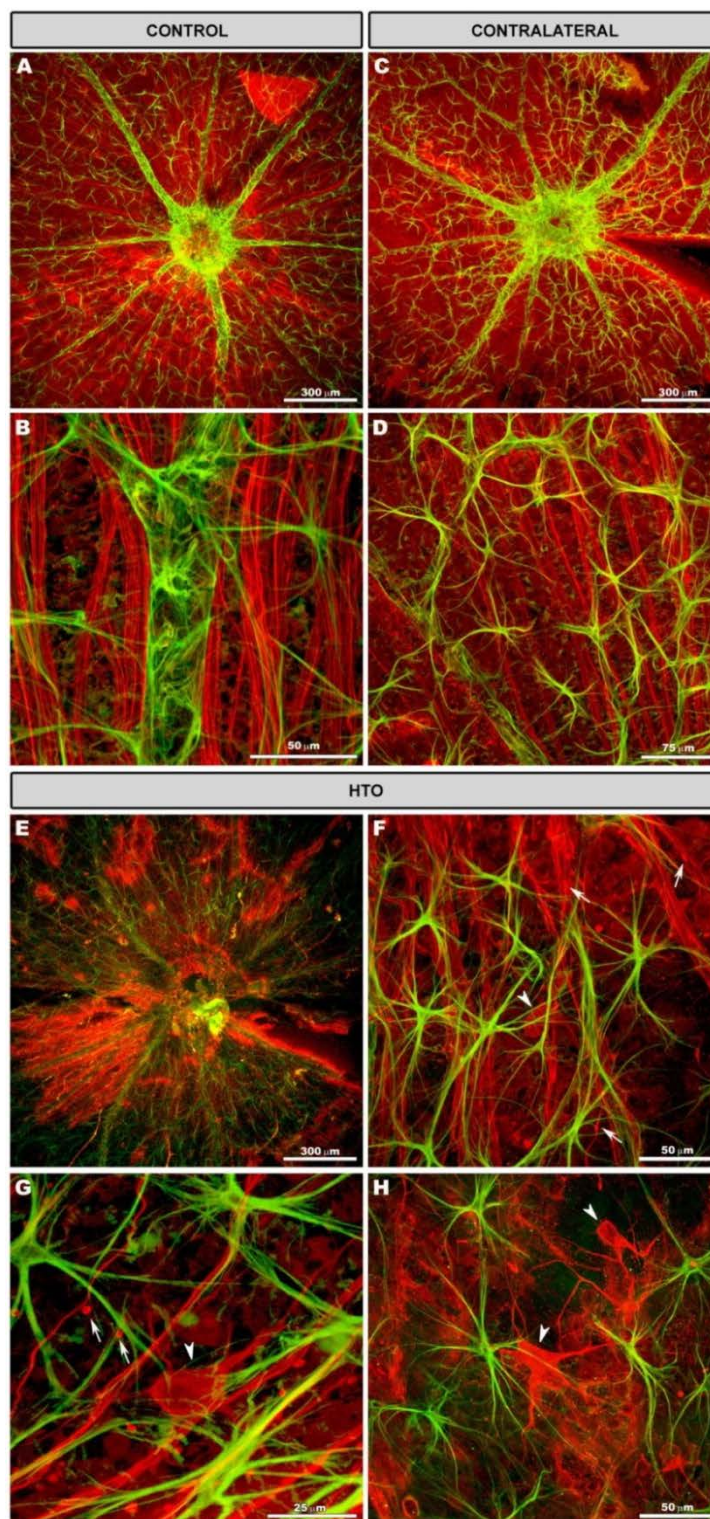


Figura 4.4. Axones, somas y dendritas proximales NF-200+ de las CGRs. Inmunofluorescencia NF-200 (verde) y GFAP (rojo). Montaje plano de retina. En el grupo control de edad (A-B), los axones NF-200+ de las CGRs tenían un aspecto rectilíneo. En los ojos contralaterales (C-D) estos axones tenían un patrón similar a los ojos control. Sin embargo, en los ojos-HTO (E-H) los axones NF-200+ perdían el aspecto rectilíneo normal y se observaban acumulaciones NF-200+ a lo largo del trayecto (flecha en F-G). En estos ojos además se observaba un inmunomarcaje NF-200+ en los somas y dendritas proximales de algunas CGRs (cabeza de flecha en F-H).

Aunque el marcaje NF-200+ se localizaba a nivel axonal, esporádicamente se observaron CGRs en los ojos control ($1,33 \pm 1,21$) y en los contralaterales ($0,20 \pm 0,45$) cuyos somas y dendritas primarias tenían un inmunomarcaje NF-200+ (Figura 4.5).

4.2.1.2 Ojos-HTO

El patrón de la inmunorreactividad NF-200+ en las retinas de los ojos-HTO mostraba claras diferencias con los otros ojos de estudio. Eran evidentes cambios ya a bajos aumentos (Figura 4.4 E). A mayor magnificación por un lado se observaba cómo los axones NF-200+ de las CGRs perdían el aspecto rectilíneo descrito previamente, y por otro, aparecían **acumulaciones NF-200+** a lo largo del trayecto axonal (Figura 4.4 F-G). Además, los **somas y las dendritas primarias** de las CGRs presentaban frecuentemente un inmunomarcaje NF-200+ (Figura 4.4 F-H). El número de CGRs con somas NF-200+ en estos ojos ($503 \pm 145,17$) era superior al observado en el grupo control ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) y en los ojos contralaterales ($P < 0,01$, prueba-t pareada) (Figura 4.5).

Número de somas-dendritas de las CGRs NF-200+			
	Control	Contralateral	HTO
Media	1,33	0,20	503,00
DT	1,21	0,45	145,17
P			<0,01
	<0,001		<0,001

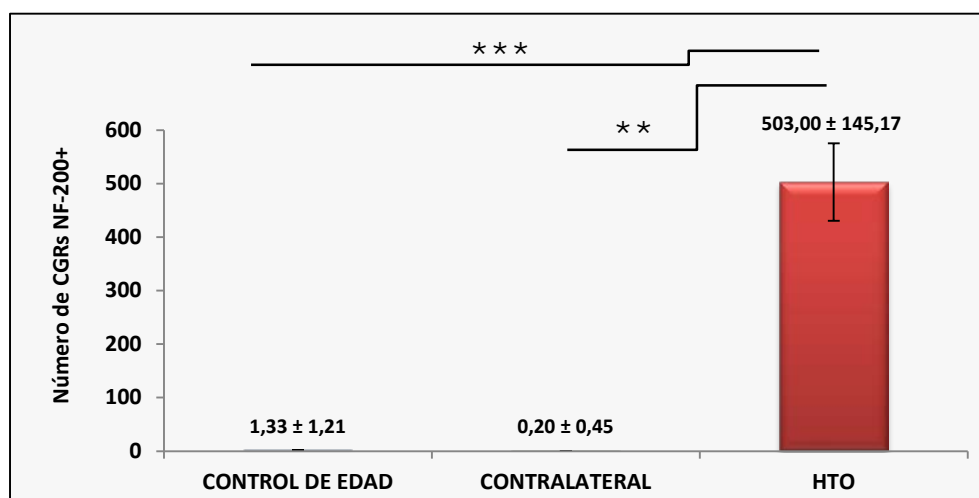


Figura 4.5. Número de somas NF-200+ de las CGRs. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

4.3 Efecto de la hipertensión ocular en las células GFAP+ de la retina: astrocitos y células de Müller

4.3.1 Descripción morfológica de las células GFAP+

4.3.1.1 Grupo control de edad

En estos ojos el inmunomarcaje GFAP+ se localizaba en unas células de aspecto estrellado, coincidentes con la morfología típica de los astrocitos.

Los **astrocitos GFAP+** se encontraban distribuidos de manera homogénea por toda la superficie retiniana formando un plexo celular entre la CFN-CCG (Figura 4.6 A), en el que cada astrocito podía ser individualizado fácilmente del resto. Estas células se localizaban bien sobre el parénquima nervioso bien sobre o muy próximas a los vasos sanguíneos (Figura 4.6 B-C).

Los astrocitos GFAP+ (Figura 4.6 D) se caracterizaban por tener un cuerpo celular redondeado u ovalado de pequeño tamaño. Por norma, del soma emergían radialmente de cuatro a ocho prolongaciones primarias de gran longitud, que podían dividirse a su vez en otras secundarias de menor calibre, dando a las células su aspecto estrellado característico. Estas prolongaciones contactaban con otros astrocitos vecinos y/o se relacionaban con arterias, venas y con otros vasos sanguíneos de menor calibre. Las prolongaciones primarias de estas células podían encontrarse rodeando directamente la pared de los vasos; sin embargo, en otras ocasiones de estas prolongaciones emergían otras secundarias que expandían sus regiones terminales en forma de abanico, las cuales contactaban con los vasos a modo de pies vasculares. Esta disposición astrocitaria constituía una envuelta glial en torno a los vasos sanguíneos que indirectamente facilitaba su visualización (Figura 4.4 A-B y Figura 4.6 A-B).

A pesar de que en general, tanto el soma como las prolongaciones de los astrocitos se disponían paralelos a la superficie retiniana, algunas prolongaciones discurrían perpendiculares a la retina y alcanzaban otros estratos más profundos próximos a la CPI.

De manera **esporádica**, se observaban unas estructuras puntiformes GFAP+ dispersas por la superficie retiniana que se correspondían con los pies terminales de las **células de Müller GFAP+** (Figura 4.6 C).

4.3.1.2 Ojos contralaterales no tratados

La morfología y distribución de los **astrocitos GFAP+** en estos ojos era similar a la descrita en el grupo control (Figura 4.6 E-H). No obstante, y a diferencia de estos últimos, los astrocitos eran cualitativamente más robustos (Figura 4.6 F-H), y debido a ello, conformaban una red celular densa, a modo de panal de abeja, sobre la superficie retiniana (Figura 4.6 E-G).

Al igual que en el grupo control, se observaban de manera **esporádica** las mismas estructuras punteadas GFAP+ que se correspondían con los pies terminales de las **células de Müller GFAP+** (Figura 4.6 E-H).

4.3.1.3 Ojos-HTO

Los **astrocitos GFAP+** mantenían su aspecto estrellado característico y una distribución retiniana similar a la descrita anteriormente en los ojos controles y contralaterales (Figura 4.6 I-L).

A diferencia de los otros ojos de estudio, en los ojos-HTO podía observarse la coexistencia de dos subpoblaciones de astrocitos GFAP+ (Figura 4.6 J-L). Una de ellas estaba compuesta por unos astrocitos de características similares a los de los otros ojos de estudio, pudiéndose observar en ellos tanto sus prolongaciones primarias como las secundarias (Figura 4.6 J-K). Sin embargo, existía otra subpoblación de astrocitos en la que tan sólo se podían apreciar sus prolongaciones primarias (Figura 4.6 J-L).

De forma característica, en estos ojos se observó un **aumento** sustancial de las estructuras puntiformes GFAP+ correspondientes con los pies terminales de las **células de Müller GFAP+**. Este inmunomarcaje era evidente por toda la retina y tapizaba los espacios del parénquima que dejaban libres las prolongaciones y los somas de los astrocitos GFAP+ (Figura 4.6 I-K).

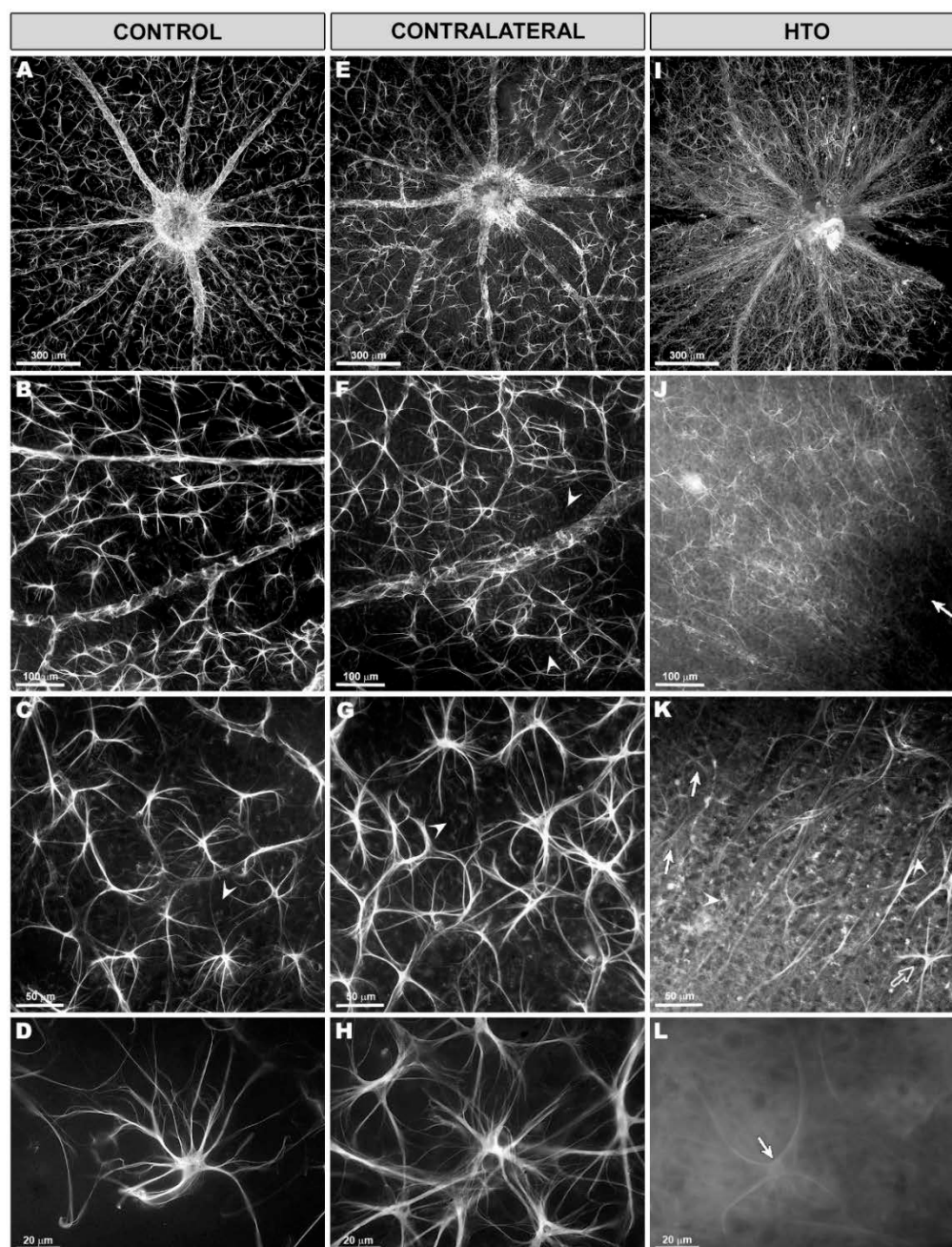


Figura 4.6. Morfología y distribución de las células GFAP+: astrocitos y células de Müller. Inmunofluorescencia GFAP. Montaje plano de retina. En los ojos control (A-D), los astrocitos GFAP+ se distribuían por toda la retina formando un mosaico (A-C). Éstos tenían una morfología estrellada (D). En los ojos contralaterales (E-H), los astrocitos GFAP+ eran más robustos y forman un plexo celular GFAP+ más denso (E-H) que en el grupo control. Se podían observar estructuras punteadas GFAP+ (cabeza de flecha en F-G) correspondientes a las células de Müller. Los astrocitos GFAP+ en los ojos-HTO (I-L) seguían manteniendo su morfología típica y se observaban distribuidos por toda la retina. En este grupo coexistían astrocitos en los que se observaban tanto sus prolongaciones primarias como secundarias (flecha hueca en K) así como otros astrocitos GFAP+ en los que tan sólo se apreciaban las prolongaciones primarias (flecha en J-L). Las estructuras puntiformes GFAP+ correspondientes con los pies terminales de las células de Müller GFAP+ tapizaban el parénquima retiniano (cabeza de flecha en I-K). [HTO: hipertensión ocular].

4.3.2 Análisis cuantitativo de las células GFAP+

4.3.2.1 Número de astrocitos GFAP+

En cada una de las áreas de retina seleccionadas el promedio de astrocitos GFAP+ fue de $198,72 \pm 33,22$ para los ojos del grupo control, de $186,33 \pm 11,33$ para los contralaterales y de $201,94 \pm 36,62$ para los ojos-HTO (Figura 4.7). El análisis estadístico de estos resultados resolvió que **el número de astrocitos no difería** entre los ojos de estudio (prueba-t).

	Número de astrocitos GFAP+		
	Control	Contralateral	HTO
Media	198,72	186,33	201,94
DT	33,22	11,33	36,62

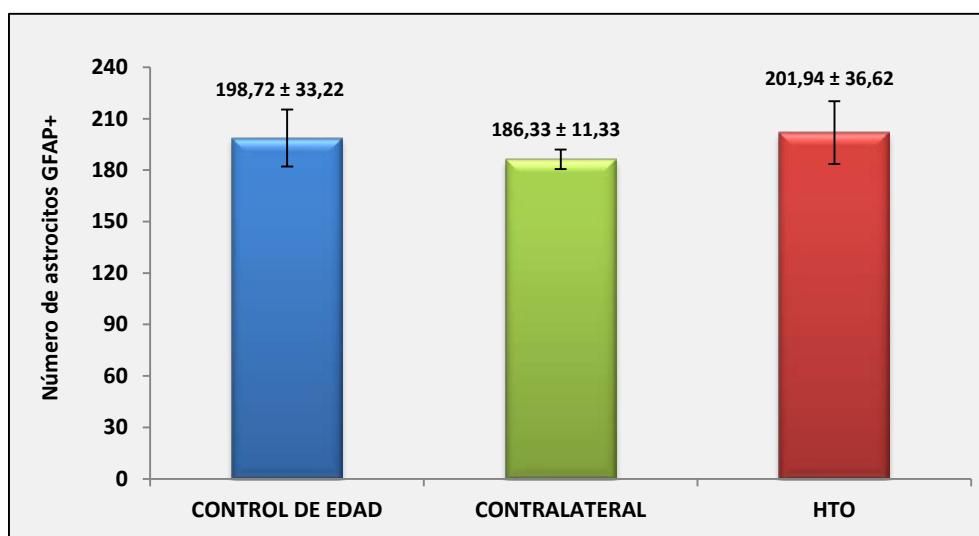


Figura 4.7. Número de astrocitos GFAP+. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

En los **ojos-HTO**, el **número de astrocitos GFAP+** en los que se podían observar las **prolongaciones primarias y las secundarias** ($125,66 \pm 22,79$), de características similares a los astrocitos del grupo control, era **menor** al encontrado en este último grupo ($P < 0,01$, prueba-t no pareada) (Figura 4.8). Los astrocitos de los ojos-HTO en los que sólo se observaban las prolongaciones primarias (76,27 de 201,94) representaban el 37,8% del total (Figura 4.9).

Número de astrocitos GFAP+ con prolongaciones 1ª y 2ª		
	Control	HTO
Media	198,72	125,66
DT	33,22	22,79
P	<0,01	

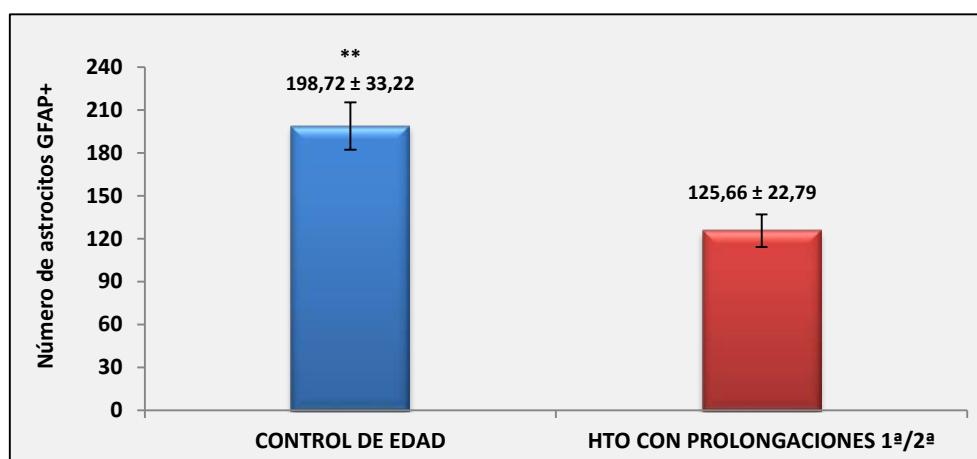


Figura 4.8. Número de astrocitos GFAP+ con prolongaciones primarias y secundarias. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles e HTO.

Subpoblaciones de astrocitos GFAP+ en los ojos-HTO		
	Con prolongaciones 2ª	Sin prolongaciones 2ª
Media	125,66	76,28
DT	22,79	13,83

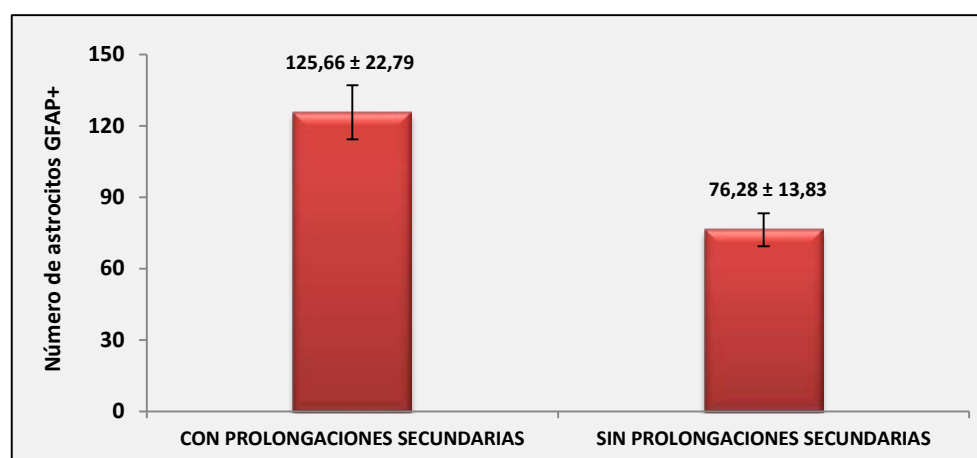


Figura 4.9. Número de astrocitos GFAP+ con y sin prolongaciones secundarias en los ojos-HTO. Valores medios y desviación estándar.

4.3.2.2 Área de retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+

El **área de la retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+ (AR-GFAP)** estaba constituida por los astrocitos y, en mayor o menor medida, por las células de Müller GFAP+ (Figura 4.6).

El **AR-GFAP** de los **ojos-HTO** ($51868,55 \pm 5460,89$) mostraba una **reducción** significativa en comparación a valores obtenidos en los ojos contralaterales ($73388,03 \pm 1848,13$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y también en los ojos del grupo control ($67583,16 \pm 7309,79$) ($P < 0,01$, prueba-t no pareada) (Figura 4.6 y Figura 4.10). Además de ello, los **ojos contralaterales** diferían de los ojos control, mostrando un **incremento** significativo del AR-GFAP ($P < 0,05$, prueba-t no pareada) (Figura 4.6 y Figura 4.11).

	AR-GFAP (mm ²)		
	Control	Contralateral	HTO
Media	67583,16	73388,03	51868,55
DT	7309,79	1848,13	5460,89
P	<0,05		
		<0,001	
	<0,01		<0,01

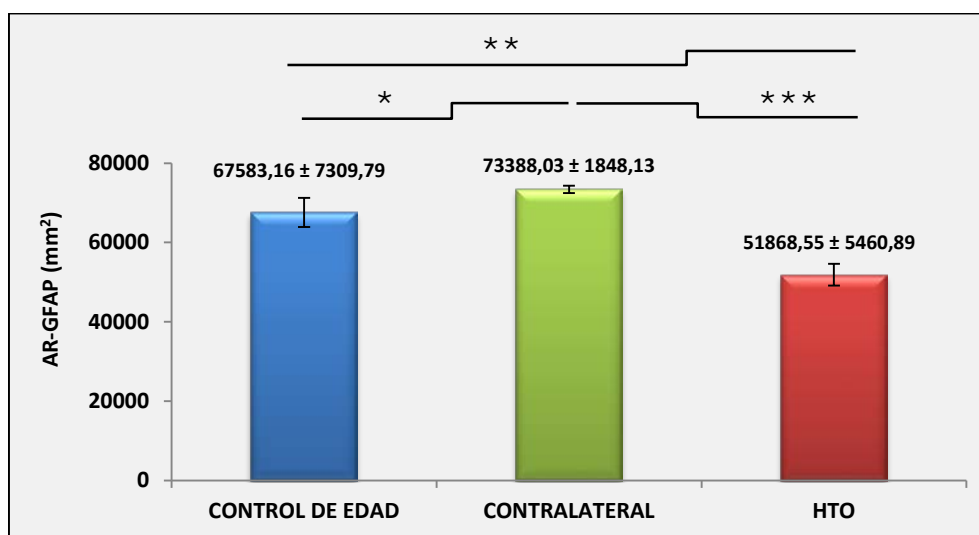


Figura 4.10. AR-GFAP. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

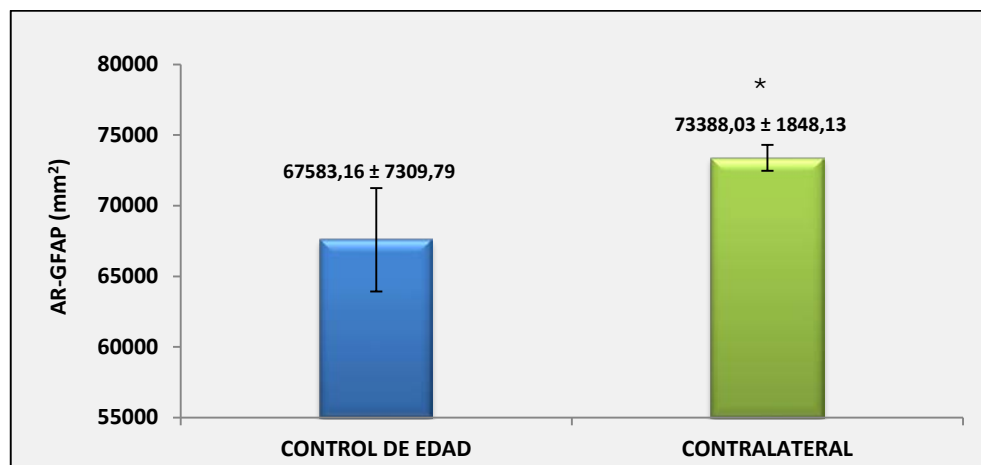


Figura 4.11. AR-GFAP. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

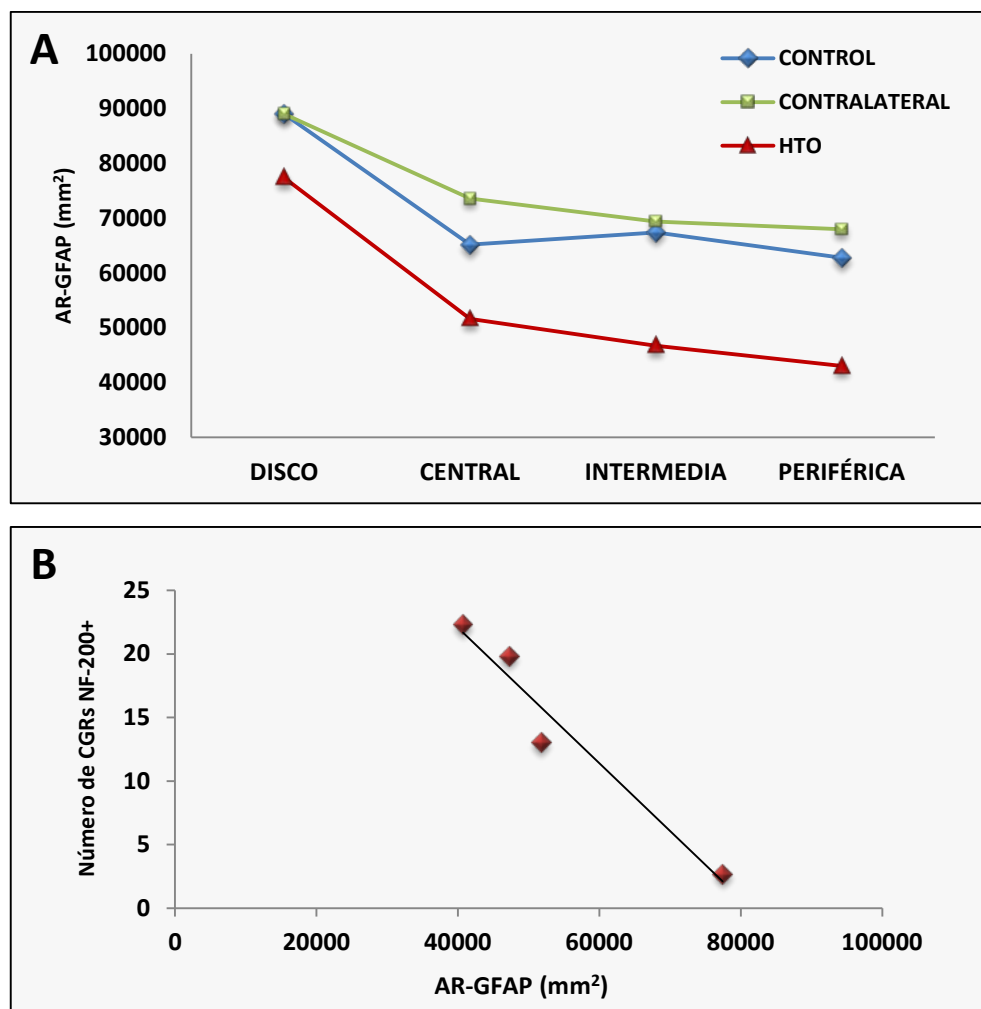


Figura 4.12. A: AR-GFAP en diferentes zonas concéntricas de la retina. Valores medios de los ojos controles, contralaterales e HTO. **B: AR-GFAP y CGRs NF-200+ en los ojos-HTO.** Correlación lineal.

En todos los ojos de estudio, el análisis de las diferentes zonas de excentricidad retinianas mostró que el AR-GFAP era mayor en la zona del disco y disminuía progresivamente hacia la retina periférica ($P<0,01$, $P<0,01$ y $P<0,001$ prueba-t pareada para control, contralateral y ojos-HTO respectivamente) (Figura 4.12 A). En los ojos-HTO, las zonas con **menor AR-GFAP** presentaban una tendencia a poseer un **mayor número de somas NF-200+ de las CGRs** ($R=-0,47$, $P<0,01$, Correlación de Pearson) (Figura 4.12 B).

4.3.3 Intensidad de la inmunorreactividad GFAP+

El promedio de la **intensidad de la IR-GFAP** del grupo control ($1329,63 \pm 161,96$) fue significativamente menor a la observada en los ojos-HTO ($2018,72 \pm 392,22$) ($P<0,01$, prueba-t no pareada), pero no difería de la de los ojos contralaterales ($1609,95 \pm 332,16$). Curiosamente, los ojos contralaterales tampoco mostraban diferencias significativas con los ojos-HTO (Figura 4.13).

Intensidad de la IR-GFAP			
	Control	Control	Control
Media	1329,63	1609,95	2018,72
DT	161,96	332,16	392,22
P	<0,01		<0,01

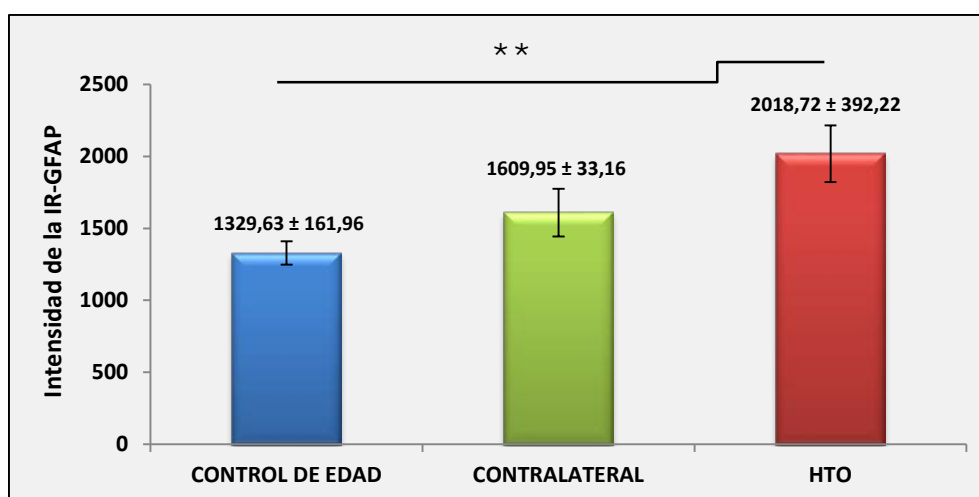


Figura 4.13. Intensidad de la IR-GFAP. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

A pesar de no obtenerse diferencias significativas entre todos los ojos de estudio, los mapas pseudocromáticos obtenidos con MATLAB®, mostraban dentro de una misma imagen la coexistencia de **diferentes niveles de intensidad de la IR-GFAP**. Esto era así tanto para los ojos contralaterales como para los ojos-HTO. Sin embargo, los ojos del grupo control parecían tener un comportamiento más homogéneo de la intensidad de la IR-GFAP (Figura 4.14). Considerando este hecho, y teniendo en cuenta que el incremento de la intensidad de la IR-GFAP se considera un signo de reactivación glial, se analizaron exclusivamente aquellas zonas de cada imagen con una intensidad de la IR-GFAP más elevada, específicamente, aquellas zonas con valores superiores a 3000 dentro de una escala de grises.

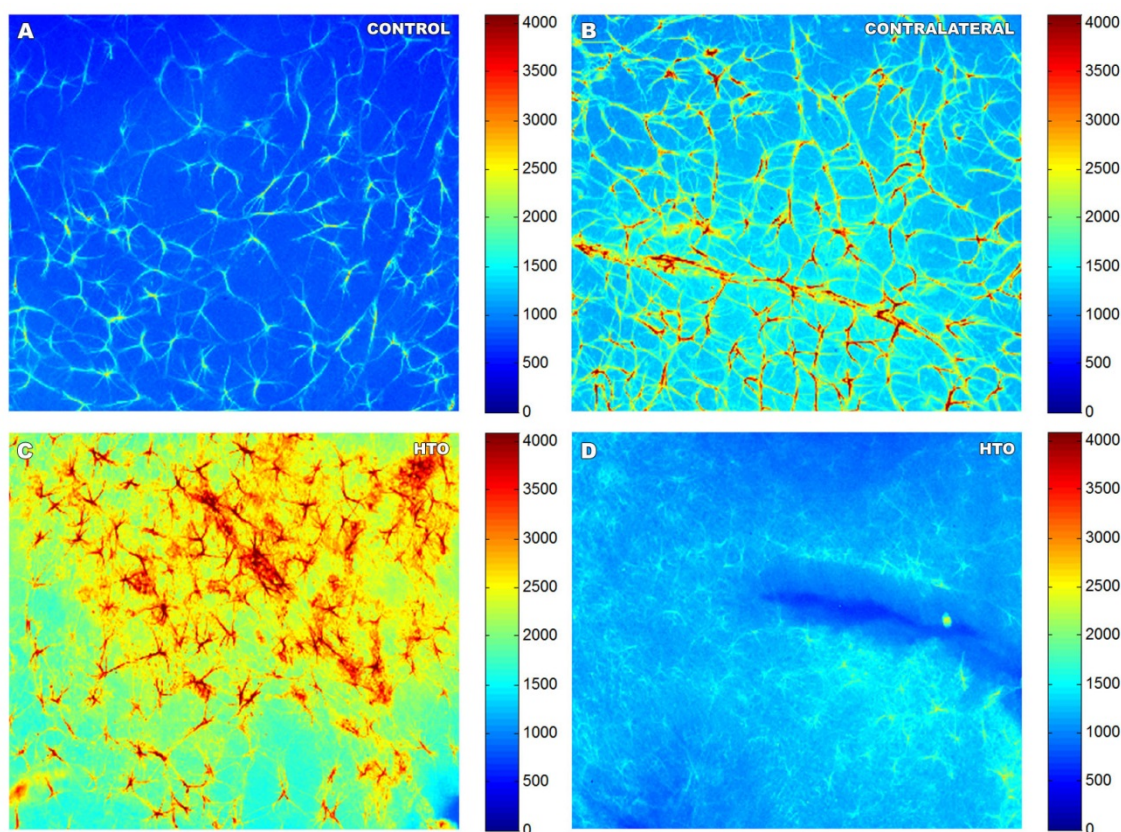


Figura 4.14. Intensidad de la IR-GFAP. Mapas pseudocromáticos. Montaje plano de retina. En los ojos del grupo control (A), la intensidad de la IR-GFAP en la retina tenía un comportamiento homogéneo; sin embargo, en los ojos contralaterales (B) y en los ojos-HTO (C-D), coexistían diferentes patrones de intensidad de la IR-GFAP.

Los resultados mostraron cómo en los **ojos contralaterales**, el porcentaje de retina con una **intensidad de la IR-GFAP** superior a 3000 ($2,02 \pm 1,76$), era **mayor** que la de los

ojos del grupo control ($0,24 \pm 0,28$) ($P < 0,05$, prueba-t no pareada). Curiosamente, los ojos contralaterales sin embargo **no diferían de los ojos-HTO** ($5,59 \pm 4,28$) (Figura 4.15).

	Intensidad >3000 AR-GFAP		
	Control	Contralateral	HTO
Media	0,24	2,02	5,59
DT	0,28	1,76	4,28
P	<0,05		

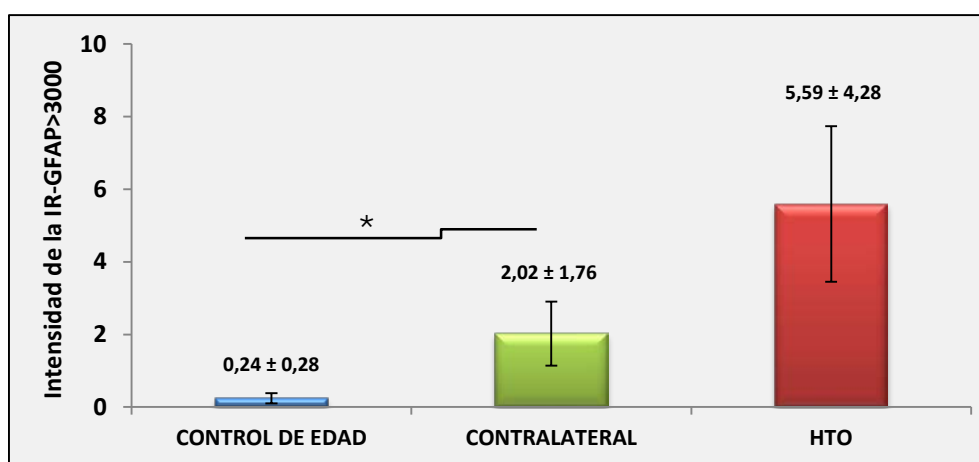


Figura 4.15. Intensidades de la IR-GFAP superiores a 3000. Valores porcentuales medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

Por otro lado, se analizaron las intensidades de la IR-GFAP de cada una de las **poblaciones de astrocitos GFAP+** descritas en los **ojos-HTO**. Los resultados mostraron que la intensidad de la IR-GFAP de los astrocitos GFAP+ en los que se podían observar tanto las prolongaciones primarias como secundarias ($3020,58 \pm 534,02$), era significativamente superior a la de aquellos en los que tan sólo podían ser reconocidas sus prolongaciones primarias ($2073,28 \pm 496,98$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) (Figura 4.16).

	Intensidad de la IR-GFAP de los astrocitos en los ojos-HTO	
	Con prolongaciones 2ª	Sin prolongaciones 2ª
Media	3020,58	2073,28
DT	534,02	496,98
P	<0,001	



Figura 4.16. Intensidad de la IR-GFAP de los astrocitos con y sin prolongaciones secundarias en los ojos-HTO. Valores medios y desviación estándar.

Sin embargo, la intensidad de la IR-GFAP de los astrocitos de los ojos-HTO siempre fue *superior* a la de los astrocitos del grupo control, tanto si en los astrocitos se observaban sus prolongaciones primarias como secundarias ($P < 0,001$, prueba-t no pareada), como si tan sólo se observaban las prolongaciones primarias ($P < 0,01$, prueba-t no pareada) (Figura 4.17).

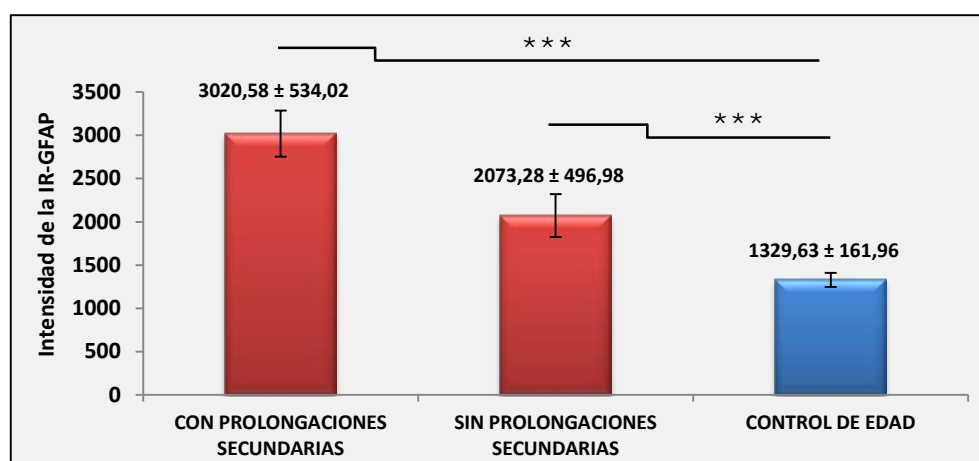


Figura 4.17. Intensidad de la IR-GFAP en los astrocitos con/sin prolongaciones secundarias de los ojos-HTO y de los astrocitos del grupo control. Valores medios y desviación estándar.

4.4 Efecto de la hipertensión ocular en las células Iba-1+ de la retina. Inmunorreacción CD68+

4.4.1 Localización y descripción morfológica de las células Iba-1+

En los ratones albinos Swiss, las células Iba-1+ se distribuían por toda la extensión retiniana localizadas en diferentes capas. Estas células estaban presentes en todas las capas de fibras, por tanto en la **CFN**, **CPI** y **CPE**, pero también en la **CCG**, en la **CFR**, de manera menos frecuente también en la **CNI**, y estaban ausentes en la **CNE**.

4.4.1.1 Células Iba-1+ de la CFN-CCG

Dada la proximidad de la CFN y de la CCG fue imposible realizar una correcta separación de las poblaciones Iba 1+ de ambos estratos. Por este motivo, y para llevar a cabo un análisis más correcto de los tejidos, se decidió formar un bloque entre ambas capas denominado CFN-CCG.

4.4.1.1.1 Grupo control de edad

En la **CFN-CCG** las células Iba-1+ estaban **distribuidas homogéneamente** por toda la superficie retiniana (Figura 4.18 A). En esta capa se distinguieron dos tipos morfológicos diferentes de células Iba-1+: unas células perivasculares con una apariencia alargada y otras células ramificadas de aspecto estrellado, ambas en relación con los vasos sanguíneos de la retina.

Las **células Iba-1+ perivasculares** tenían un apariencia alargada y disponían tanto su soma como sus prolongaciones sobre la pared de los vasos (Figura 4.19 B y Figura 4.29 A-a). Éstas se caracterizaban por ser células poco ramificadas y por tener un soma y unas prolongaciones celulares toscas. Era una población celular no muy abundante y presentaban especial predilección por los grandes vasos venosos, encontrándose frecuentemente en las proximidades de la cabeza del nervio óptico y sobre un vaso venoso retiniano dispuesto en forma de corona en la zona de la ora serrata.

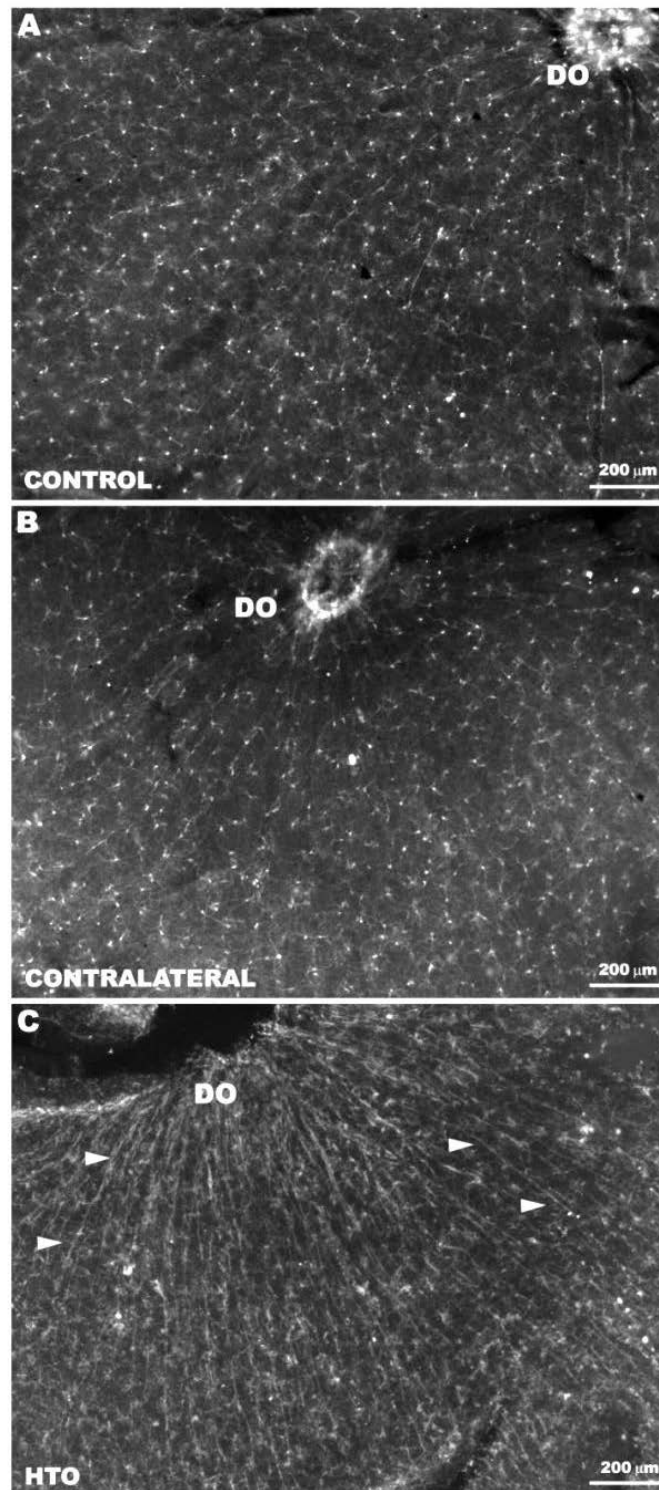


Figura 4.18. Distribución de las células Iba-1+ en la CFN-CCG. Inmunofluorescencia Iba-1. Montaje plano de retina. En los ojos del grupo control (A) y en los contralaterales (B), las células Iba-1+ de aspecto estrellado eran el tipo morfológico predominante. Estas células se distribuían en la CFN-CCG por toda la retina de manera homogénea formando un mosaico celular. En los ojos-HTO (C), se observaban unas células Iba-1+ alargadas en forma de bastón, que se alineaban entre sí formando trenes celulares (cabeza de flecha) por toda la retina. [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; DO: disco óptico; HTO: hipertensión ocular].

Las **células Iba-1+ ramificadas** (Figura 4.19 A-B y Figura 4.29 A-b) eran las más comunes dentro de esta capa y se disponían bien sobre los vasos sanguíneos, o bien en las zonas intervasculares. Los somas de estas células eran pequeños y tenían una conformación ovoidea o triangular. De ellos emergían de entre dos a cuatro prolongaciones primarias, que se dicotomizaban en prolongaciones secundarias más finas, a partir de las cuales podían surgir otras terciarias cortas y finas. Todas éstas se caracterizaban por tener un aspecto varicoso y algunas presentaban en la región terminal unas dilataciones a modo de bulbo. Tanto el soma como gran parte de las prolongaciones de estas células se disponían paralelas a la superficie retiniana, no obstante, otras emergían del soma perpendicularmente ocupando diferentes niveles dentro de esta capa.

4.4.1.1.2 Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO

En estos ojos seguían observándose los dos tipos morfológicos de células Iba-1+ descritos en el grupo control, sin embargo, las células experimentaban una **retracción de sus prolongaciones** en los ojos contralaterales (Figura 4.19 C-D y Figura 4.29 B), algo que era más evidentes en los ojos-HTO (Figura 4.19 E-H y Figura 4.29 C). Las dilataciones terminales a modo de bulbo de las células Iba-1+ de morfología estrellada ahora era poco frecuente encontrarlas en los ojos contralaterales (Figura 4.19 C-D y Figura 4.29 B-b) y llegaban incluso a desaparecer en los ojos-HTO (Figura 4.19 E, F, H y Figura 4.29 C-b).

De forma novedosa, se observaron unas **células Iba-1+ de aspecto ameboideo** diseminadas por la retina en los ojos contralaterales (Figura 4.19 D, Figura 4.29 B-c y Figura 4.49 A), y frecuentemente en los ojos-HTO (Figura 4.19 G, Figura 4.29 C-c y Figura 4.49 C). Éstas tenían unos somas de mayor tamaño que los típicos de las células de esta capa y unas prolongaciones muy cortas, o incluso podían carecer de ellas.

Algo exclusivo que sólo se pudo observar en los ojos-HTO, fue la presencia de dos nuevos tipos morfológicos de células Iba-1+: unas células redondeadas Iba-1+ y unas células Iba-1+ en bastón.

Las **células redondeadas Iba-1+** (Figura 4.19 G, Figura 4.29 C-d y Figura 4.49 C, E) tenían un gran tamaño y se encontraban adyacentes a los vasos sanguíneos (Figura 4.49 C)

o distribuidas por el parénquima retiniano. Preferentemente éstas se localizaban próximas a la región del nervio óptico (Figura 4.49 E) o en la retina más periférica y en ocasiones estaban rodeadas por las prolongaciones de las células Iba-1+ ramificadas de esta capa (Figura 4.49 C). Aunque estas células en ocasiones se asemejaban bastante a las de aspecto ameboideo, sin embargo tenían una menor expresión Iba-1+ (Figura 4.19 G y Figura 4.49 C).

Las **células Iba-1+ en bastón** (Figura 4.19 H, Figura 4.29 C-e) tenían un cuerpo celular alargado. De ambos polos del soma emergían sus prolongaciones celulares, que generalmente se proyectaban en sentidos opuestos, dando a la célula una apariencia alargada o de bastón. Estas células característicamente se unían a las células Iba-1+ en bastón vecinas, entendiéndose por “unión” una gran proximidad física entre ellas. La sucesión de múltiples células Iba-1+ en bastón daba lugar a la formación de unas estructuras a modo de trenes celulares (Figura 4.18 C). Éstos se disponían paralelos a la superficie retiniana y discurrían de forma radial desde el disco óptico, donde eran más evidentes, hacia la retina periférica. En estos trenes celulares, las células Iba-1+ en bastón se relacionaban entre sí de tres maneras diferentes. En primer lugar, mediante la unión de la prolongación de una célula con la prolongación de la célula vecina. (Figura 4.20 A1, A3); en segundo lugar, mediante la unión de la prolongación de una célula con el soma de la célula anexa (Figura 4.20 B1, B3), y por último, mediante la unión de los somas de dos células próximas (Figura 4.20 C1, C3).

A diferencia de las células Iba-1+ ramificadas de esta capa de los ojos control (Figura 4.21 A) y de los ojos contralaterales (Figura 4.21 B), las cuales se relacionaban tan sólo parcialmente con los axones NF-200+ de las CGRs, las células Iba-1+ en bastón discurrían generalmente paralelas al curso de los axones NF-200+ de las CGRs (Figura 4.21 C). Sus prolongaciones podían alcanzar y rodear a las CGRs NF-200+ o llegar a la CPI (Figura 4.22 y Figura 4.23), y en otras ocasiones la célula completa podía observarse cómo se había desviado de su trayectoria dentro del tren para contactar con los somas y las dendritas de las CGRs NF-200+ (Figura 4.23 C1-C2).

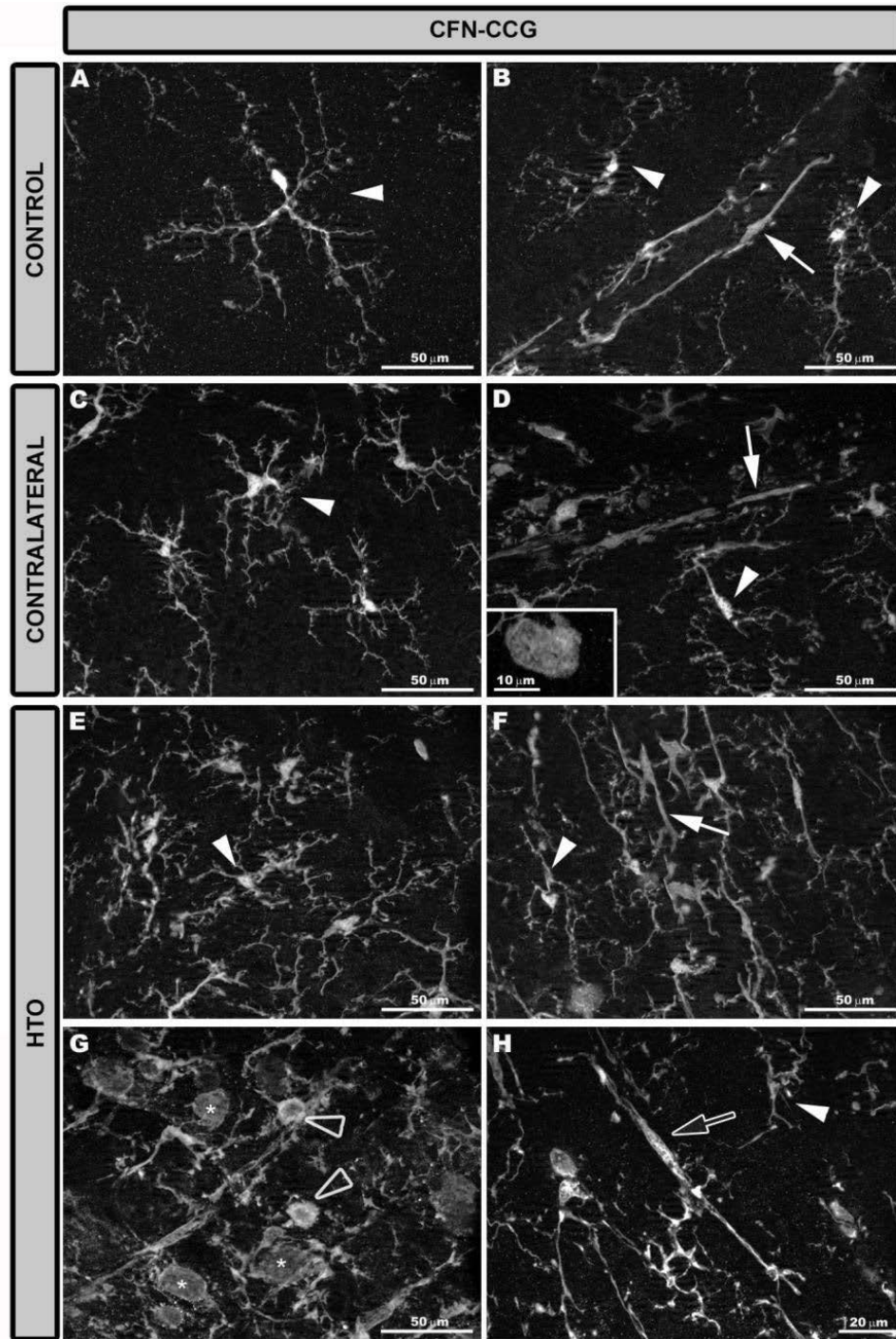


Figura 4.19. Células Iba-1+ de la CFN-CCG. Inmunofluorescencia Iba-1. Montaje plano de retina. En los ojos control (A-B) existían unas células ramificadas Iba-1+ de aspecto estrellado (cabeza de flecha en A-B) y otras perivasculares de morfología alargada (flecha en B). Tanto en los ojos contralaterales (C-D) como en los ojos-HTO (E-H), las células Iba-1+ ramificadas (cabeza de flecha en C-F, H) y perivasculares (flecha en D, F) mostraban una retracción de sus prolongaciones. En los ojos contralaterales (recuadro en D), y más en los ojos-HTO (cabeza de flecha hueca en G), se observaban unas células Iba-1+ de aspecto ameboideo. En los ojos-HTO aparecían dos nuevos tipos morfológicos de células Iba-1+, unas de apariencia redondeada (asterisco en G) y otras en forma de bastón (flecha hueca en H). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; HTO: hipertensión ocular].

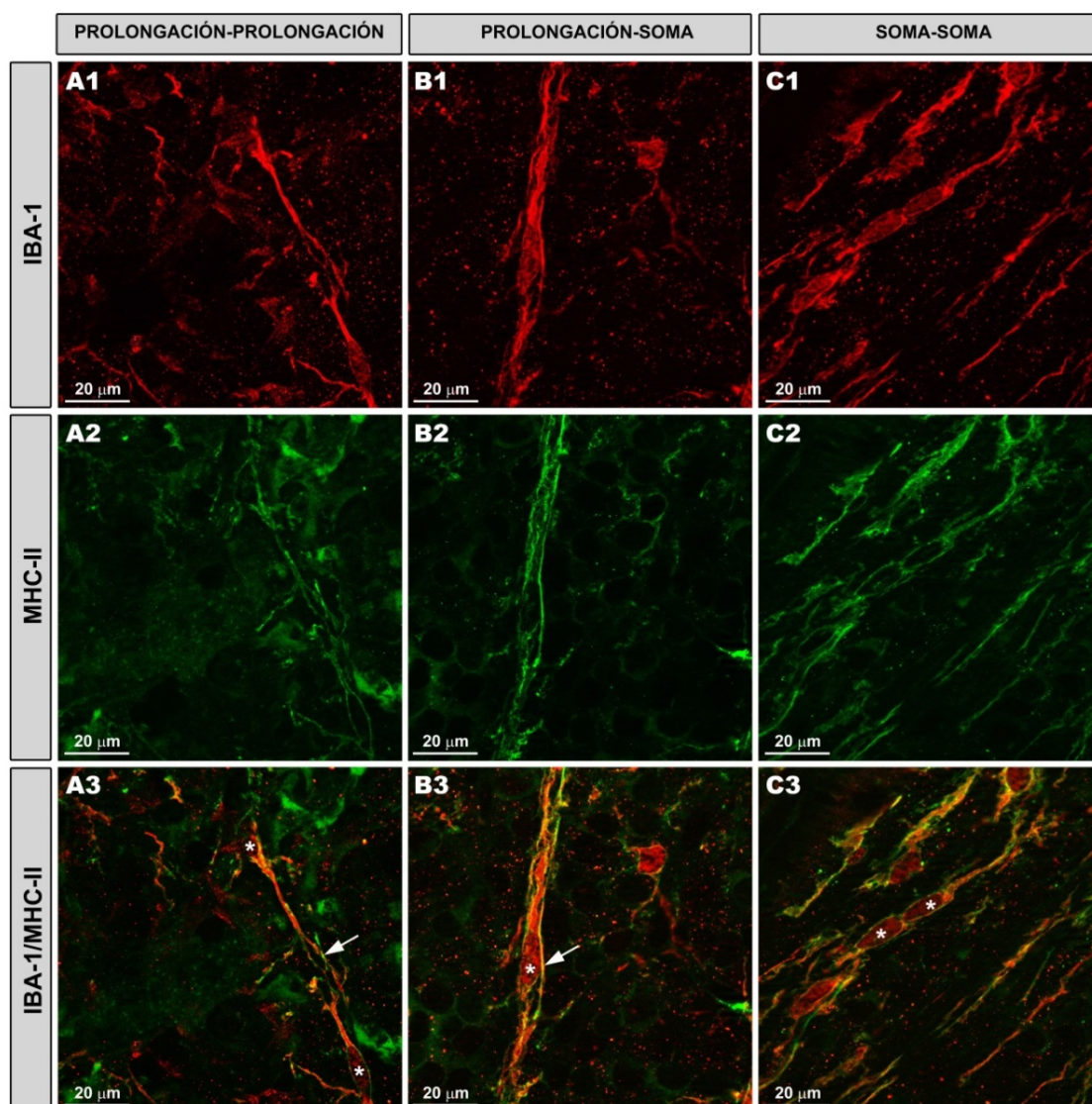


Figura 4.20. Patrones de relación entre las células Iba-1+ en bastón de la CFN-CCG. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y MHC-II (verde). Montaje plano de retina. Las células Iba-1+ en bastón se relacionaban entre sí principalmente de tres formas diferentes: la primera, mediante una unión prolongación-prolongación (**A1-A3**), en la cual las prolongaciones de las células en bastón vecinas parecían estar entrelazadas; otra mediante una relación prolongación-soma (**B1-B3**), en la que la prolongación de una célula Iba-1+ en bastón parecía rodear el cuerpo celular de la siguiente célula en bastón del tren celular; y finalmente mediante una relación soma-soma (**C1-C3**), en la que los cuerpos celulares de dos células Iba-1+ en bastón estaban aparentemente en contacto. Estas células de la CFN-CCG mostraban un inmunomarcaje MHC-II+ (**A2-A3, B2-B3, C2-C3**). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; HTO: hipertensión ocular; asterisco: soma; flecha: prolongación].

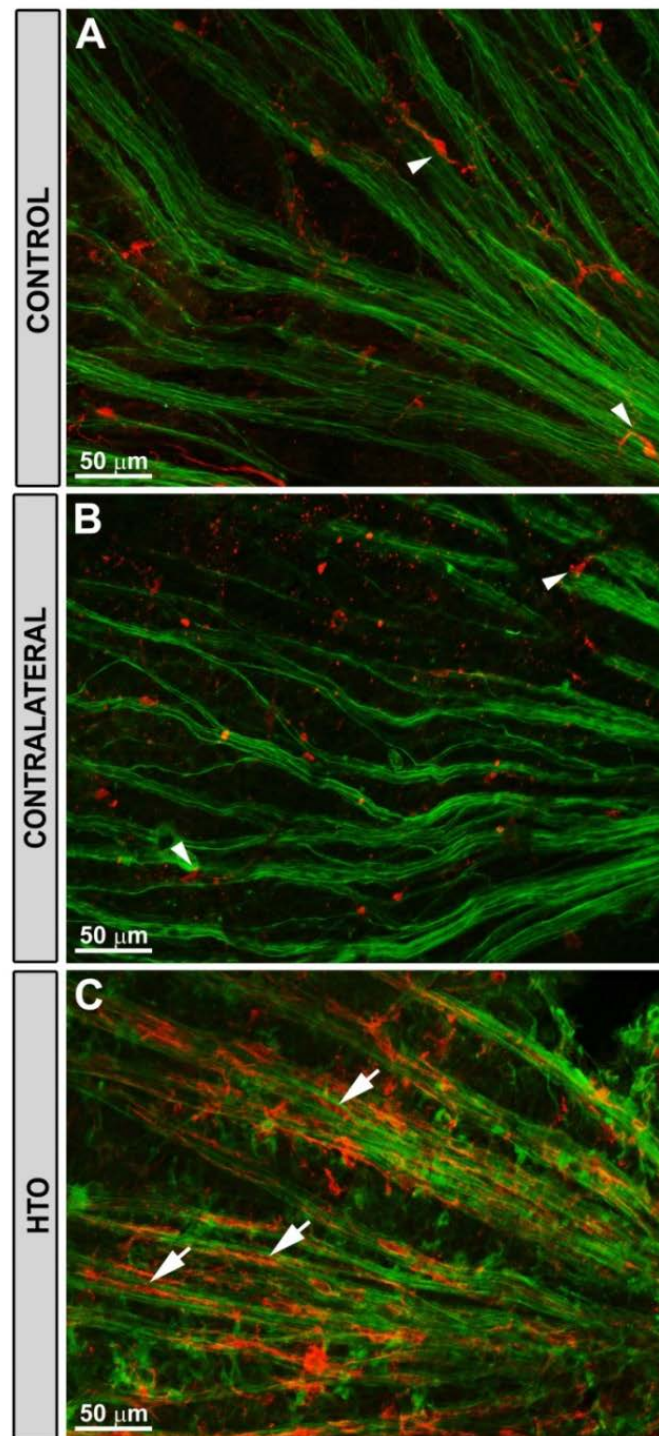


Figura 4.21. Relación de las células Iba-1+ en bastón de la CFN-CCG con los axones NF-200+ de las CGRs. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y NF-200 (verde). Montaje plano de retina. En los ojos control (A) y en los ojos contralaterales (B) algunas de las prolongaciones de las células Iba-1+ de morfología ramificada (cabeza de flecha en A-B) estaban en relación con los axones NF-200+ de las CGRs, sin embargo, estas células no discurrían paralelas al curso de estos axones. Por el contrario, las células Iba-1+ en bastón en los ojos-HTO (C) se posicionaban paralelas y muy próximas a los axones NF-200+ de las CGRs (flecha en C). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CGRs: células ganglionares de la retina; NF: neurofilamento; HTO: hipertensión ocular].

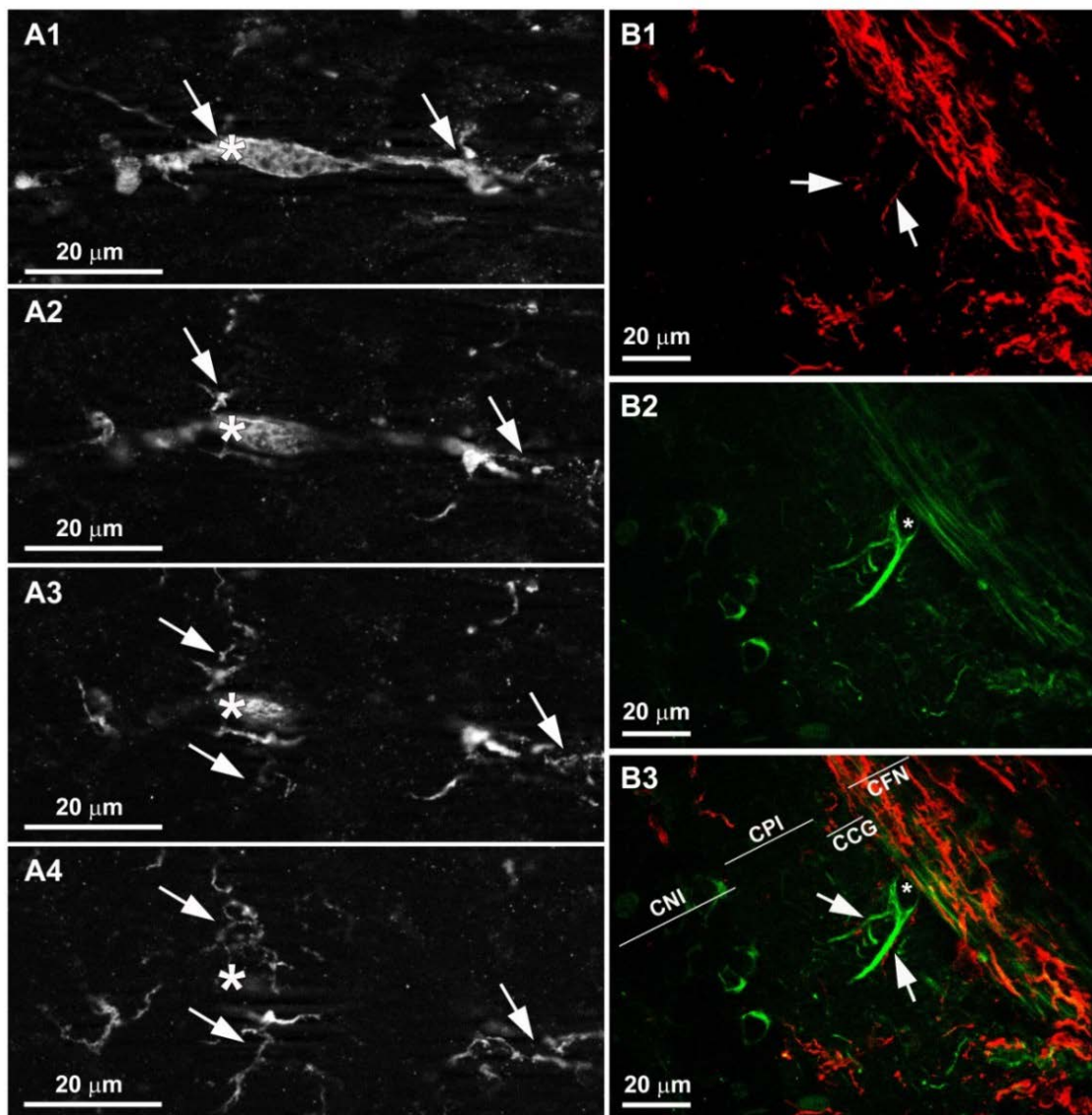


Figura 4.22 Las prolongaciones de las células Iba-1+ en bastón de la CFN-CCG alcanzaban capas retinianas más externas. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y NF-200 (verde). Montaje plano de retina. El análisis de la retina en el eje Z (**A1-A4**), permitió observar cómo algunas prolongaciones de las células Iba-1+ en bastón alcanzaban la CCG e incluso la CPI. La presión que el cubreobjetos ejercía sobre el montaje plano de retina en ocasiones permitía analizar el borde de la preparación de una forma transversal, obteniéndose una imagen similar a la de una sección histológica. En este borde se podía observar cómo las células Iba-1+ en bastón (**B1, B3**) alcanzaban la CPI y aparentemente se relacionaban con las dendritas de las CGRs NF-200+ (**B2, B3**). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CGRs: células ganglionares de la retina; NF: neurofilamento; HTO: hipertensión ocular; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; asterisco: soma de las CGRs NF-200+; flecha: prolongación de las células Iba-1+ en bastón].

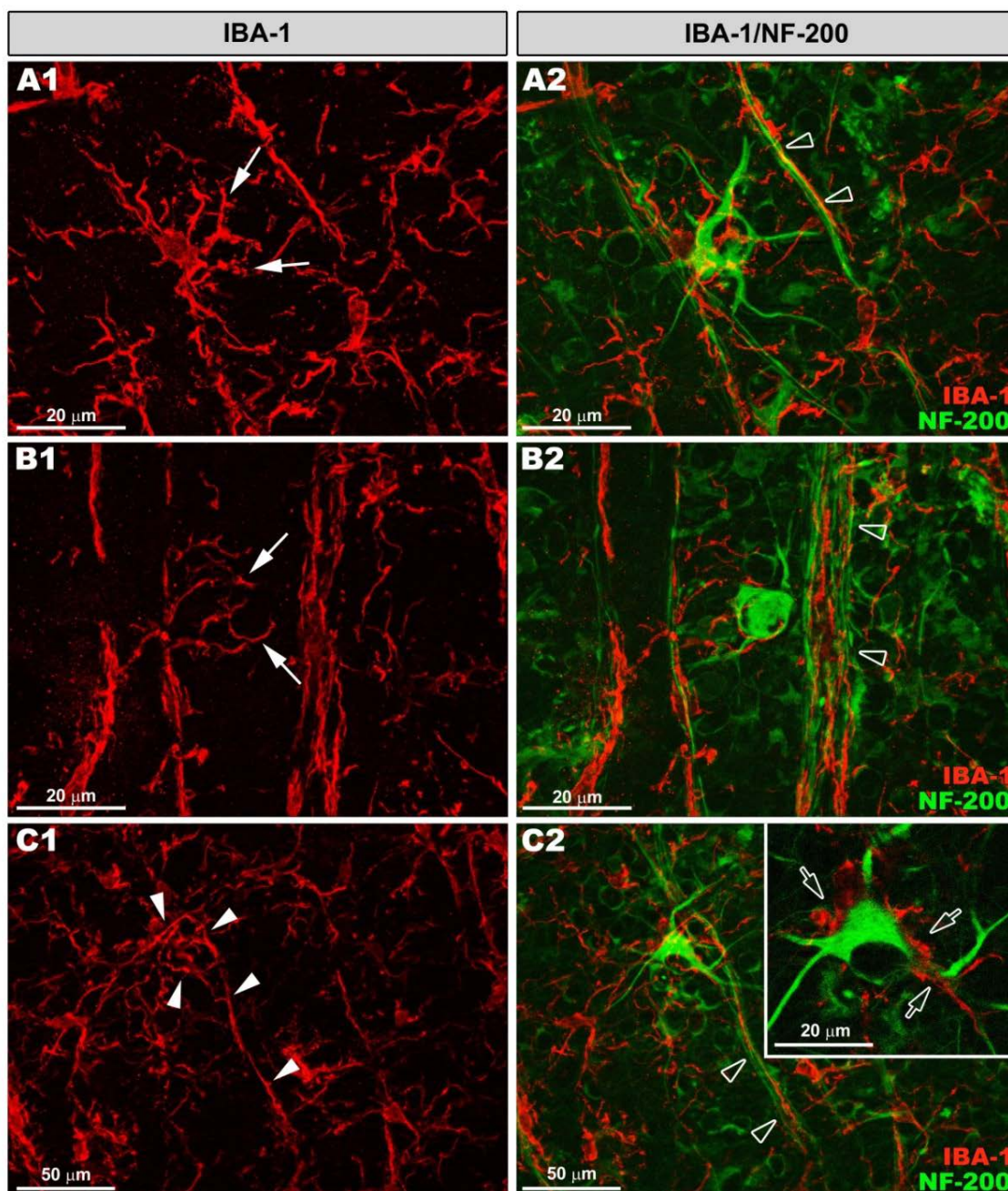


Figura 4.23. Relación de las células Iba-1+ en bastón de la CFN-CCG con las CGRs NF-200+. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y NF-200 (verde). Montaje plano de retina. De forma anómala en los ojos-HTO aparecía una inmunotinción NF-200+ en algunos somas y dendritas proximales de las CGRs (**A2, B2, C2**). Las células Iba-1+ en bastón (cabeza de flecha hueca en **A2, B2, C2**) se disponían habitualmente paralelas al curso de los axones NF-200+. No obstante, algunas prolongaciones de estas células Iba-1+ (flecha en **A1, B1**) se relacionaban con las CGRs NF-200+, aparentemente de una forma muy estrecha (flecha hueca del recuadro en **C2**). En algunos casos, las células Iba-1+ en bastón se desviaban de su trayectoria (cabeza de flecha en **C1**), paralela a los axones NF-200+ dentro del tren celular, para rodear con sus prolongaciones al soma y a las dendritas proximales de las CGRs NF-200+ (**C2**). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CGRs: células ganglionares de la retina; NF: neurofilamento; HTO: hipertensión ocular].

4.4.1.2 Células Iba-1+ de la CPI

4.4.1.2.1 Grupo control de edad

Entre las células Iba-1+ de esta capa se diferenciaron unas células ramificadas con aspecto estrellado y otras con aspecto dendritiforme.

Las **células Iba-1+ de aspecto estrellado** (Figura 4.24 A-C y Figura 4.29 D-a) tenían un pequeño soma triangular u ovalado del cual emergían de entre tres a cuatro prolongaciones primarias finas y largas. Estas se dividían dicotómicamente en prolongaciones secundarias, que a su vez daban lugar a terciarias, siendo estas últimas más cortas y poco numerosas. Todas estas prolongaciones tenían un aspecto varicoso o arrosariado que daban a la célula una apariencia irregular y la mayoría de ellas tenían dilataciones terminales a modo de bulbo.

Estas células se disponían por toda la extensión retiniana de forma regular formando una estructura a modo de **mosaico**. En él, cada célula ocupaba un espacio o dominio propio, en el que no se observaban solapamientos o contactos entre las células vecinas (Figura 4.24 A-B). Dentro de esta capa, las células estaban distribuidas en dos estratos diferentes; uno próximo a la CCG y otro próximo a la CNI. Tanto sus somas como las prolongaciones celulares, se posicionaban generalmente **paralelos a la superficie retiniana**; sin embargo, algunas prolongaciones podían alcanzar tanto la CCG como la CNI (Figura 4.25 A).

Las **células Iba-1+ de aspecto dendritiforme** en esta capa (Figura 4.24 C y Figura 4.29 D-b) tenían un soma grueso del que emergían de dos a cuatro prolongaciones primarias toscas. A su vez, éstas daban lugar a otras prolongaciones secundarias más cortas y del mismo grosor que las anteriores. Todas estas características conferían a las células un aspecto similar al de las células dendríticas. Estas células eran **poco numerosas**, se disponían paralelas a la superficie retiniana y se localizaban característicamente en el **área yuxtapapilar** y en una zona de la **retina periférica** próxima a la ora serrata.

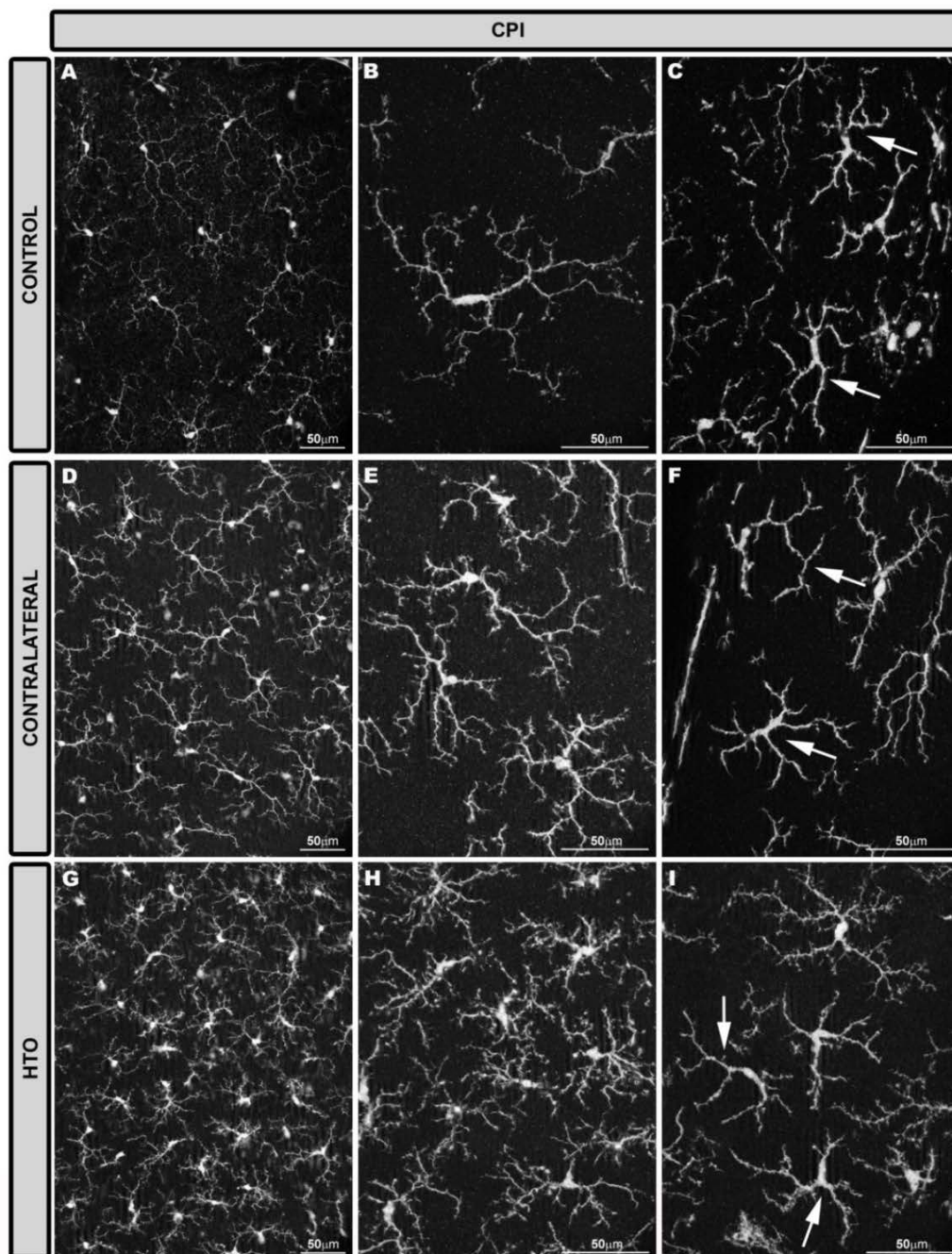


Figura 4.24. Células Iba-1+ de la CPI. Inmunofluorescencia Iba-1+. Montaje plano de retina. En los ojos control (**A-C**), contralaterales (**D-F**) y en los ojos-HTO (**G-I**), la mayoría de las células Iba-1+ de la CPI se ramificaban profusamente, lo que otorgaba a estas células una apariencia estrellada. Junto a ellas, se observaba otra pequeña población de células Iba-1+ poco ramificadas de un aspecto dendritiforme (flecha en **C, F, I**). Las células Iba-1+ se distribuían homogéneamente por toda la retina en esta capa formando una estructura a modo de mosaico (**A, D, G**). Tras la inducción de la HTO, este entramado celular se hacía más denso en los ojos contralaterales (**D-E**) y más aún en los ojos-HTO (**G-H**). Las células Iba-1+ de esta capa mostraban signos de reactivación. Entre ellos, las células de aspecto estrellado retraían sus prolongaciones celulares y tanto estas células como las de aspecto dendritiforme incrementaban el número de prolongaciones secundarias y de orden superior, siendo todos estos cambios más pronunciados en los ojos-HTO (**G-I**) que en los contralaterales (**D-F**). [CPI: capa plexiforme interna; HTO: hipertensión ocular].

4.4.1.2.2 Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO

Seguían observándose las mismas células descritas en el grupo control.

En las células Iba-1+ de aspecto estrellado las **prolongaciones celulares** se encontraban más **retraídas** y desaparecían las dilataciones terminales a modo de bulbo (Figura 4.24 D-I y Figura 4.29 E-F, a). De estas prolongaciones emergían otras más finas, que dotaban a la célula de un aspecto espiculado irregular y poco definido. En cuanto a su distribución, se observaban algunos somas **desplazados** a la CCG y/o la CNI, pero siempre próximos a la CPI, y muchas de sus prolongaciones se disponían perpendiculares a la superficie de la retina introduciéndose en las capas anexas (Figura 4.25 B-C). El **mosaico celular** que formaban estas células era **más denso** que en los ojos del grupo control, sin embargo seguían sin observarse contactos y/o solapamientos entre las células Iba-1+ vecinas (Figura 4.24 D-E, G-H). Las células Iba 1+ de aspecto dendritiforme se caracterizaban por presentar unas prolongaciones secundarias, y de orden superior, muy finas y numerosas (Figura 4.24 F, I y Figura 4.29 E-F, b).

Aunque los cambios celulares descritos estaban presentes tanto en los ojos contralaterales como en los ojos-HTO, eran más notables en estos últimos ojos.

4.4.1.3 Células Iba-1+ de la CNI

4.4.1.3.1 Grupo control de edad

La presión que ejercía el cubreobjetos sobre la preparación de retina, permitía a veces observar en el borde del tejido una imagen similar a una sección histológica. Gracias a ello, en las retinas del grupo control, se observaron **esporádicamente**, algunas células Iba-1+ en la CNI que ocupaban todo el espesor de la capa (Figura 4.26 A). Éstas presentaban unos cuerpos celulares dispuestos **perpendicularmente** a la superficie de la retina y sus prolongaciones emergían de manera apical desde la célula y se ramificaban una vez que alcanzaban la CPI y la CPE. Estas células eran escasas y no constituían un plexo celular a través de la retina, sin embargo sus prolongaciones estaban involucradas en los plexos celulares tanto de la CPI como de la CPE.

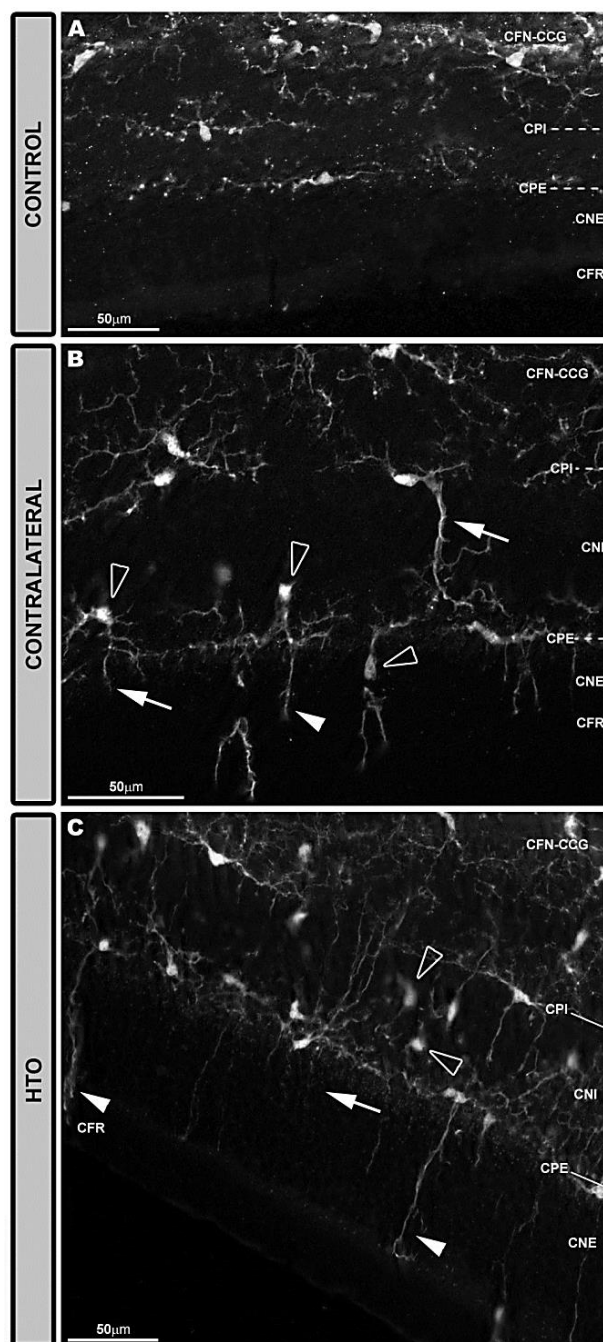


Figura 4.25. Distribución de las células Iba-1+ en la retina. Inmunofluorescencia Iba-1. Montaje plano de retina. Imagen semejante a una sección histológica transversal proporcionada por la presión ejercida por el cubreobjetos en el borde del tejido. Las células Iba-1+ en los ojos del grupo control **(A)** estaban distribuidas en diferentes estratos retinianos. Los somas y las prolongaciones de estas células se disponían paralelas a la superficie de la retina. Sin embargo, en los ojos contralaterales **(B)** tanto los somas (cabeza de flecha hueca) como las prolongaciones (flecha) se desplazaban e invadían respectivamente la CNI y la CNE, pudiendo incluso algunas prolongaciones más largas alcanzar la CPE y la CFR (cabeza de flecha). El comportamiento de las células Iba-1+ en los ojos-HTO **(C)** era similar, aunque más marcado, al de los ojos contralaterales. [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

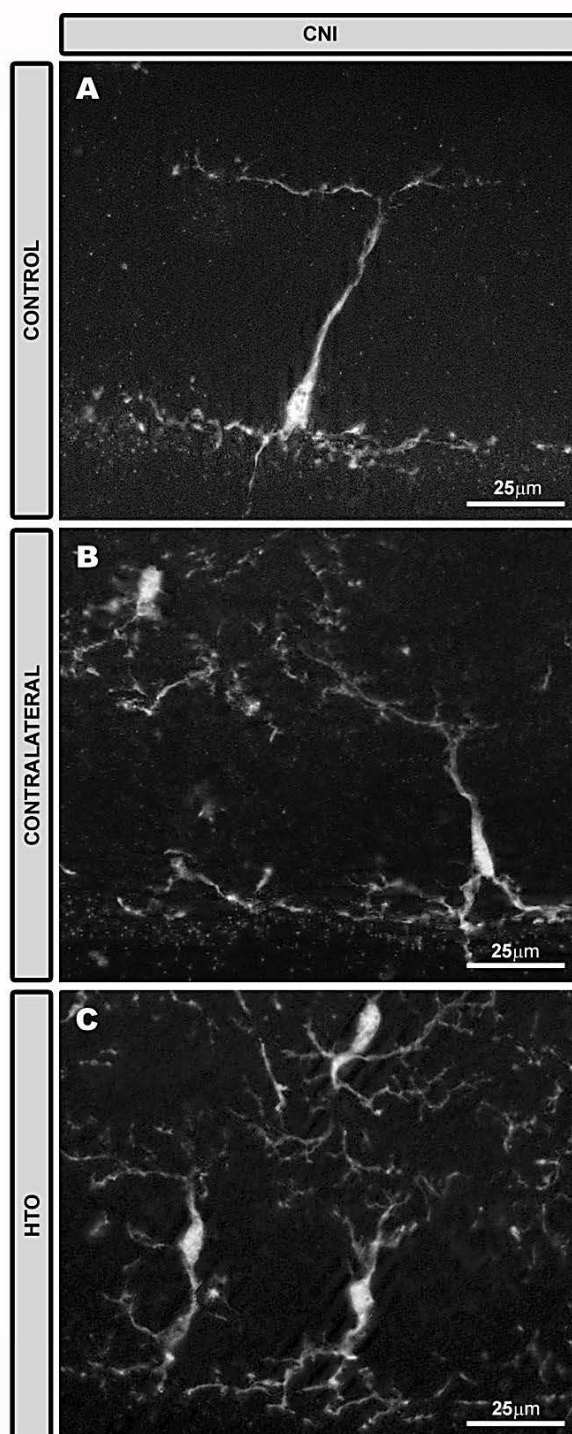


Figura 4.26. Células Iba-1+ de la CNI. Inmunofluorescencia Iba-1+. Montaje plano de retina. Imagen semejante a una sección histológica transversal proporcionada por la presión ejercida por el cubreobjetos en el borde del tejido. En los ojos control (**A**) se observaban unas células Iba-1+ en la CNI cuyos somas discurrían perpendicularmente a la superficie retiniana. De ellos emergían sus prolongaciones; éstas ocupaban todo el espesor de la capa y se ramificaban en las proximidades de la CPI y de la CPE. En los ojos contralaterales (**B**), y de manera más acusada en los ojos-HTO (**C**), estas células se observaban frecuentemente pero sus prolongaciones estaban más retraídas. [CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa; HTO: hipertensión ocular].

4.4.1.3.2 Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO

Comparativamente con las retinas control, en los ojos contralaterales (Figura 4.26 B) y en los ojos-HTO (Figura 4.26 C), estas células se observan más frecuentemente a lo largo de la capa y se caracterizan por tener unas prolongaciones celulares más retraídas. Todos estos cambios, nuevamente eran más acentuados en los ojos-HTO.

4.4.1.4 Células Iba-1+ de la CPE

4.4.1.4.1 Grupo control de edad

En esta capa sólo se observaba un único tipo morfológico de células Iba-1+, unas **células ramificadas de aspecto estrellado** (Figura 4.27 A-C y Figura 4.29 G).

Los somas de estas células eran pequeños, de apariencia oval o triangular. Del cuerpo celular emergían de dos a cuatro prolongaciones primarias largas, las cuales se dividían dicotómicamente en prolongaciones secundarias más finas y éstas a su vez lo hacían en otras terciarias muy numerosas, finas y de longitud variable. Además, de las prolongaciones primarias podían emerger también otras secundarias cortas y finas. Todo esto hacía que estas células tuviesen un aspecto muy ramificado.

Las células Iba-1+ en esta capa **se distribuían regularmente** por toda la superficie retiniana formando un **mosaico** celular, aparentemente más denso que el observado en la CPI (Figura 4.27 A-B). En él, las células vecinas no se solapaban ni contactaban entre sí, ocupando cada una un dominio espacial propio. Estas células se disponían generalmente **paralelas a la superficie retiniana**; sin embargo algunas de sus prolongaciones se dirigían hacia las capas nucleares anexas. En ocasiones podían observarse unas prolongaciones celulares largas que discurrían perpendicularmente a la superficie retiniana hacia la CNE, algunas de las cuales de forma infrecuente alcanzaban la CFR. Estas últimas presentaban unas dilataciones de su región terminal a modo de copa o vesícula (Figura 4.29 G).

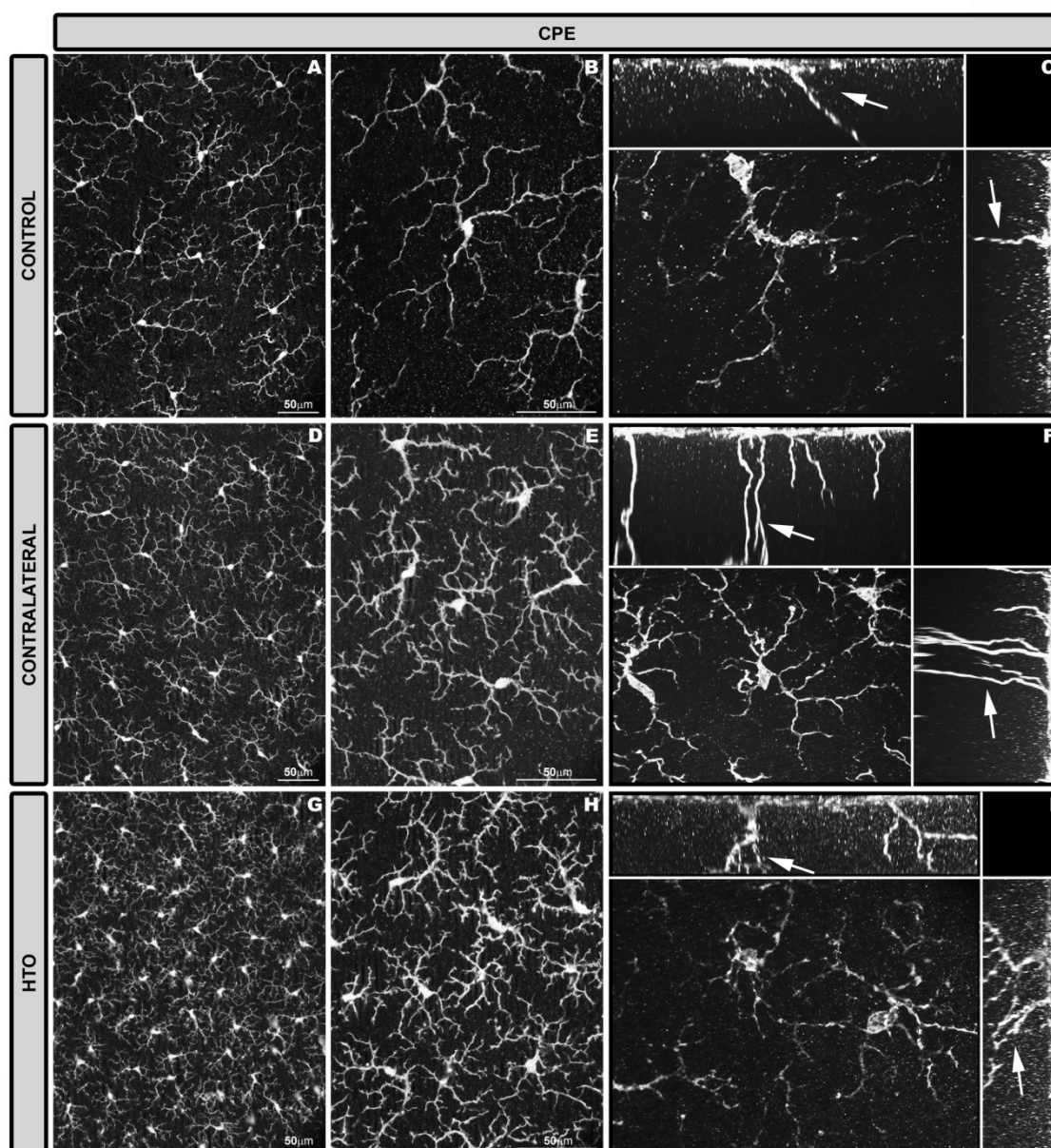


Figura 4.27. Células Iba-1+ de la CPE. Inmunofluorescencia Iba-1+. Montaje plano de retina. En los ojos control (**A-C**), contralateral (**D-F**) y en los ojos-HTO (**G-I**), las células Iba-1+ en la CPE estaban profusamente ramificadas, lo que daba a las células una apariencia estrellada. Las células Iba-1+ de esta capa se distribuían por toda la retina formando un mosaico celular (**A-B, D-E, G-H**). De forma secundaria a la HTO, este entramado celular se hacía más denso en los ojos contralaterales (**D-E**) y más aún en los ojos-HTO (**G-H**). Las células Iba-1+ mostraban signos de reactivación. Entre ellos la retracción de sus prolongaciones y el incremento de las prolongaciones secundarias y de orden superior, siendo estos cambios más pronunciados en los ojos-HTO (**G-I**) que en los contralaterales (**D-F**). El análisis sagital (ejes YZ) y coronal (ejes XY) del tejido gracias a la herramienta “cut view” de Axiovision (**C, F, I**), mostraba cómo algunas células Iba-1+ tenían unas prolongaciones largas que discurrían a través de la CNE en los tres ojos de estudio (flecha en **C, F, I**), llegando a alcanzar incluso la CFR. En comparación con los ojos del grupo control (**C**), estas prolongaciones se observaron de manera más frecuente en los ojos contralaterales (**F**), y más aún en los ojos-HTO (**I**). [CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

4.4.1.4.2 Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO

En ambos grupos seguía observándose el mismo tipo morfológico de células Iba-1+ descrito en las retinas control. Estas células no obstante experimentaban una **retracción de sus prolongaciones** celulares y de ellas emergían otras secundarias y de orden superior más finas y numerosas, que dotaban a la célula de un aspecto espiculado irregular y poco definido (Figura 4.27 D-I y Figura 4.29 H-I). Los somas de algunas células estaban **desplazados** a la CNI o a la CNE y frecuentemente sus prolongaciones celulares invadían las capas nucleares anexas. Las prolongaciones largas que se disponían perpendiculares a la retina eran más numerosas y la inmensa mayoría alcanzaban la CFR (Figura 4.25 B-C). El **mosaico celular** que conformaban estas células era aparentemente más **denso** que en los ojos del grupo control, pero seguían sin observarse contactos y/o solapamientos entre las células vecinas (Figura 4.27 D-E, G-H).

Todos estos cambios descritos a pesar de ser compartidos por ambos grupos, se observaban de forma más acentuada en los ojos-HTO.

4.4.1.5 Células Iba-1+ de la CFR

4.4.1.5.1 Grupo control de edad

Las células Iba-1+ de esta capa estaban distribuidas característicamente de manera **irregular**, sin formar un mosaico celular. Se diferenciaron dos tipos morfológicos de células Iba-1+: unas con somas ovoideos muy ramificadas y otras con somas alargados poco ramificados.

En esta capa, el tipo morfológico mayoritario respondía a unas **células Iba-1+ con somas ovoideos** (Figura 4.28 A y Figura 4.29 J-a), de los cuales emergían desde un mismo punto numerosas prolongaciones a modo de plumero. Los somas se localizaban junto a o dentro de la CNI, y las prolongaciones discurrían por la CFR de manera perpendicular a la superficie de la retina.

Las **células Iba-1+ con somas alargados** (Figura 4.28 B y Figura 4.29 J-b) generalmente tenían una única prolongación primaria tosca de la que emergían unas pocas

prolongaciones cortas y finas. Estas células se disponían paralelas a la superficie de la retina en la zona más próxima al EPR, observándose más frecuentemente en las proximidades de la ora serrata.

4.4.1.5.2 Ojos contralaterales no tratados y ojos-HTO

En estos ojos se observaron los mismos tipos celulares descritos en las retinas control, aunque con ciertas modificaciones, y su distribución seguía sin ser homogénea.

Las células Iba-1+ con somas ovoideos (Figura 4.28 C, E y Figura 4.29 K-L, a) se encontraban **desplazadas** a las proximidades del EPR y se localizaban junto a otras células del mismo tipo formando pequeños grupos. Característicamente, todas las células de un mismo grupo polarizaban sus prolongaciones hacia una misma dirección y sentido. En los ojos contralaterales estas prolongaciones comenzaban a cambiar su orientación y pasaban de colocarse perpendiculares a paralelas a la superficie retiniana (Figura 4.28 C y Figura 4.29 K-a), y ya en los ojos-HTO, la mayor parte de estas células disponían tanto el soma como las prolongaciones de forma completamente paralela a la superficie retiniana (Figura 4.28 E y Figura 4.29 L-a).

Por otro lado, las células Iba-1+ con somas alargados (Figura 4.28 D, F, G y Figura 4.29 K-L, b) presentaban una **retracción de sus prolongaciones** y a lo largo de toda la célula, aparecían unas prolongaciones finas, cortas y poco definidas que daban a la célula un aspecto peludo y difuso.

En los ojos contralaterales se observaban de forma esporádica unas **células Iba 1+ de aspecto ameboideo** (Figura 4.28 D, Figura 4.29 K-c y Figura 4.48 C) que no estaban presentes en los ojos del grupo control, y éstas eran también evidentes en los ojos-HTO (Figura 4.28 H, Figura 4.29 L-c y Figura 4.48 E), similares a las de la CFN-CCG.

Además, en los ojos-HTO se localizaron eventualmente en la retina periférica algunas **células Iba-1+ de apariencia redondeada** (Figura 4.28 H, Figura 4.29 L-d y Figura 4.48 E-F) formando pequeños grupos y otras células Iba-1+ de aspecto dendritiforme (Figura 4.28 G, Figura 4.29 L-e), similares a las descritas en la CPI.

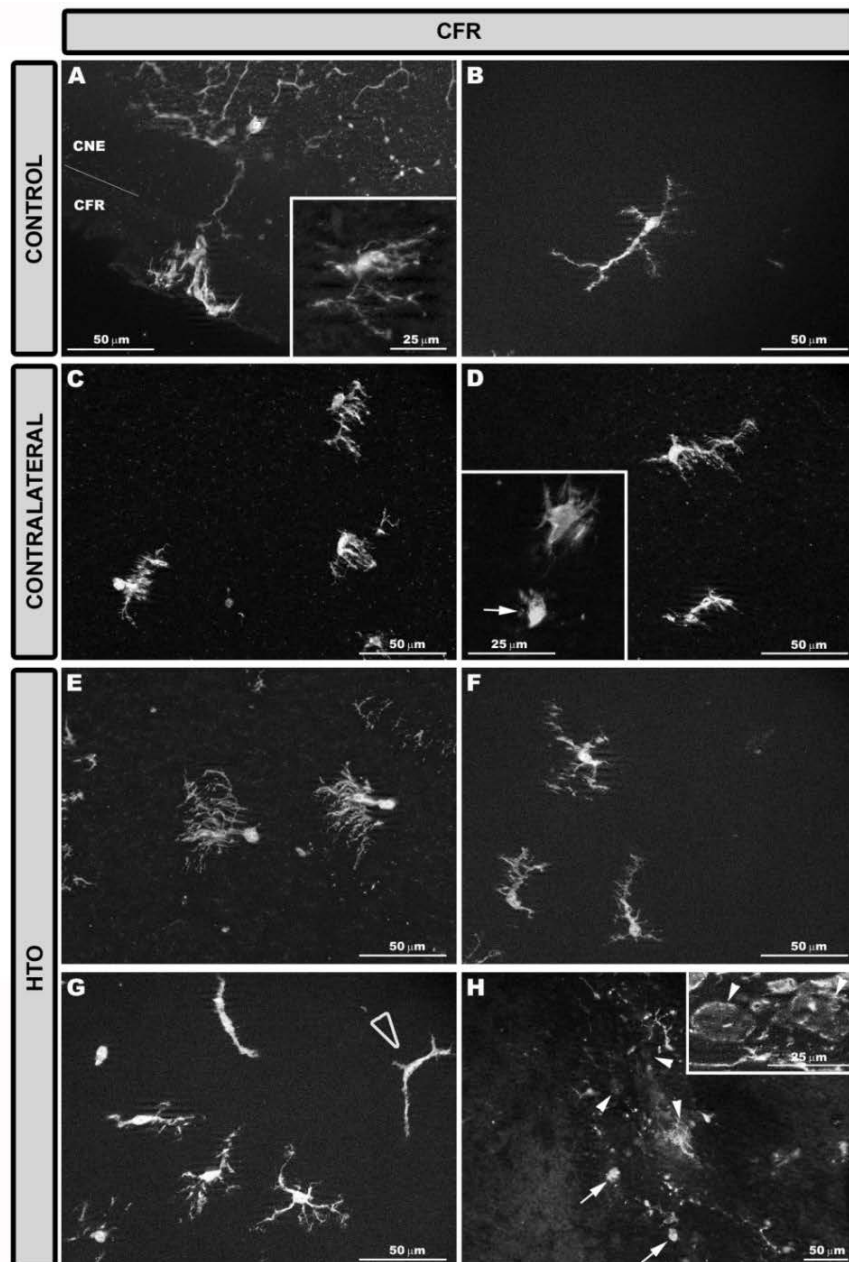


Figura 4.28. Detalle de las células Iba-1+ de la CFR. Inmunofluorescencia Iba-1+. Montaje plano de retina. Aparecían unas células Iba-1+ de somas ovoideos muy ramificadas (**A, C, E**) y otras con somas alargados (**B, D, F, G**). Gracias a la presión ejercida por el cubreobjetos en la preparación, en el borde de la retina se observaba cómo las células Iba-1+ de somas ovoideos (**A**) tenían múltiples prolongaciones que emergían de un mismo punto del soma a modo de plumero. En los ojos control estas prolongaciones discurrían perpendicularmente a la superficie de la retina por todo el espesor de la CFR. Las prolongaciones de estas células en los ojos contralaterales (**C**) y en los ojos-HTO (**E**) se reorientaban y se posicionaban paralelas a la superficie de la retina. En comparación con los ojos control (**B**), las células de somas alargados en los ojos contralaterales (**D**) y en los ojos-HTO (**F**) mostraban una retracción y una mayor complejidad de sus prolongaciones. En los ojos contralaterales (flecha del recuadro en **D**) y en los ojos-HTO (flecha en **H**) aparecían unas células Iba-1+ de aspecto ameboideo. De forma exclusiva en los ojos-HTO se observaban unas células Iba-1+ de apariencia dendriforme (cabeza de flecha hueca en **G**) y otras células Iba-1+ de aspecto redondeado (cabeza de flecha en **H**). [CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

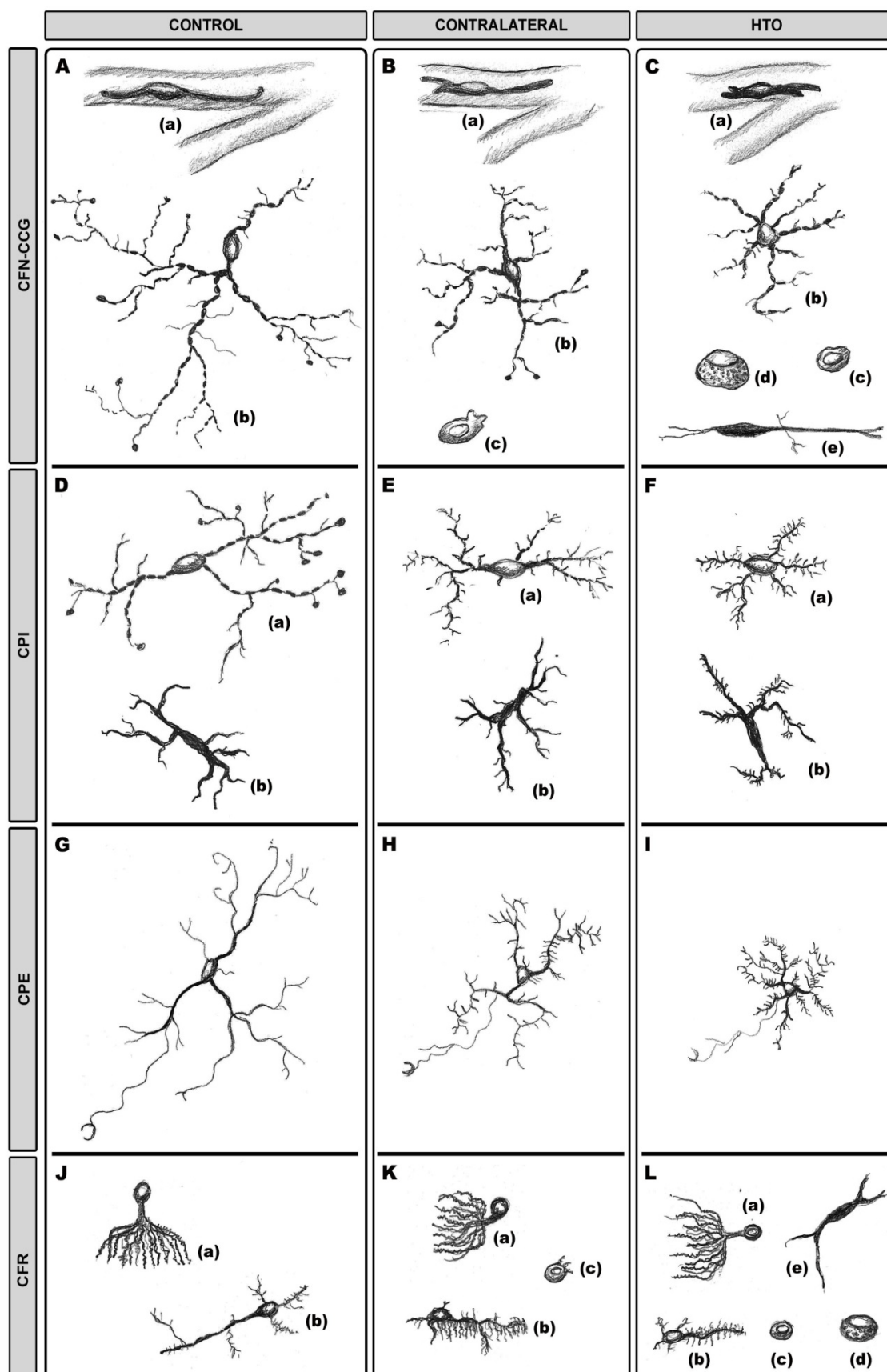


Figura 4.29. Esquema resumen a escala de los tipos morfológicos celulares Iba-1+ de la retina en los ojos del grupo control, contralateral e HTO. Cambios morfológicos a escala de la población celular Iba-1+ secundarios a la HTO. Las variaciones morfológicas que experimentaban las células Iba-1+ en los ojos-HTO eran similares, pero más acusadas, a las que sufrían los ojos contralaterales. En la CFN-CCG (**A-C**), las células Iba-1+ perivasculares (**a**) y las ramificadas de aspecto estrellado (**b**) sufrían una retracción de sus prolongaciones. En estas últimas, las dilataciones terminales a modo de bulbo que se observaban en los ojos del grupo control disminuían en los ojos contralaterales (**B**) llegando a desaparecer por completo en los ojos-HTO (**C**). En esta capa, se observaban unas células Iba-1+ de aspecto ameboideo (**c**) en los ojos contralaterales (**B**) y en los ojos-HTO (**C**). Sólo en estos últimos ojos (**C**) se encontraron células Iba-1+ de aspecto redondeado (**d**) y otras alargadas en forma de bastón (**e**). En la CPI (**D-F**) las células Iba-1+ de aspecto estrellado (**a**) se caracterizaban por sufrir un acortamiento y un aumento de la complejidad de sus prolongaciones celulares tanto en los ojos contralaterales (**E**) como en los ojos-HTO (**F**). En las células Iba-1+ de aspecto dendritiforme (**b**) de esta capa aumentaba el número de prolongaciones secundarias y de orden superior en los ojos contralaterales (**E**) y en los ojos-HTO (**F**). Las células Iba-1+ de aspecto estrellado de la CPE (**G-I**) en los ojos contralaterales (**H**) y en los ojos-HTO (**I**) mostraban una retracción de sus prolongaciones. En la CFR (**J-L**), las células Iba-1+ de somas ovoideos (**a**), que en los ojos del grupo control (**J**) se disponían perpendiculares a la superficie de la retina, experimentaban una reorientación de sus prolongaciones en los ojos contralaterales (**K**) y en los ojos-HTO (**L**) para colocarse ahora paralelas a la superficie retiniana. Las células de somas alargados (**b**) en los ojos contralaterales (**K**) y en los ojos-HTO (**L**) mostraban una retracción y una mayor complejidad de sus prolongaciones, lo que daba a la célula un aspecto peludo y difuso. En esta capa aparecían células Iba-1+ de aspecto ameboideo (**c**) en los ojos contralaterales (**K**) y en los ojos-HTO (**L**). En éstos últimos (**L**) se observaban además unas células Iba-1+ de aspecto redondeado (**d**) y otras con apariencia dendritiforme (**e**). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa; CNE: capa nuclear externa; CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

4.4.2 Análisis cuantitativo de las células Iba-1+

4.4.2.1 Área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba-1+ en la CFN-CCG

El área de la retina ocupada por el inmunomarcaje Iba 1+ (**AR-Iba1**) de la CFN-CCG de los ojos-HTO ($19090,57 \pm 6040,56$) experimentaba un incremento significativo respecto a los valores encontrados tanto en los ojos contralaterales ($4689,97 \pm 359,47$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) como en los ojos del grupo control ($4096,94 \pm 260,97$) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.30). Curiosamente, los ojos contralaterales tenían una mayor AR-Iba1 que la observada en los ojos control ($P < 0,01$, prueba-t no pareada) (Figura 4.31).

AR-Iba1 de la CFN-CCG			
	Control	Contralateral	HTO
Media	4096,94	4689,97	19090,57
DT	260,97	359,47	6040,56
P	<0,01		
		<0,001	
	<0,001		<0,001

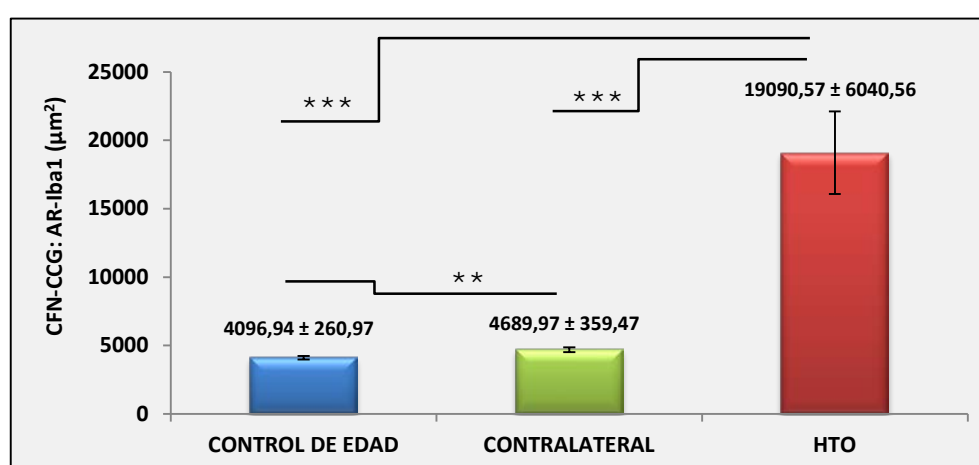


Figura 4.30. AR-Iba1 en la CFN-CCG. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

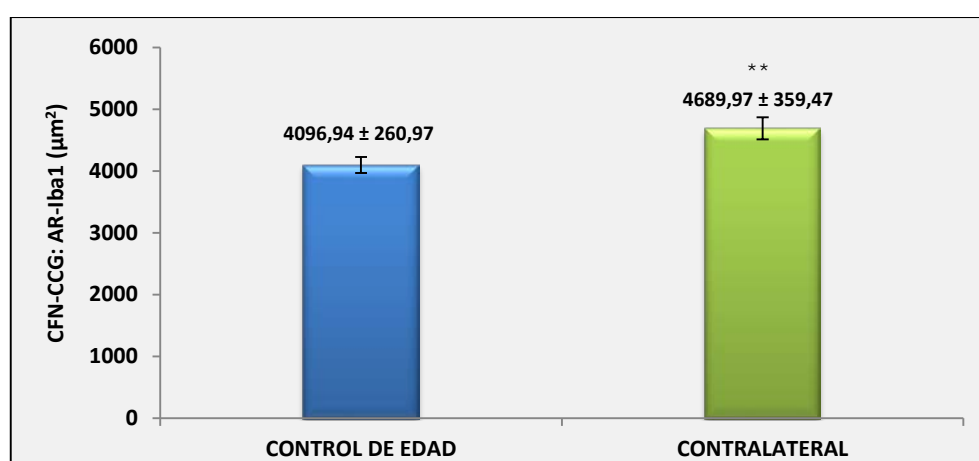


Figura 4.31. AR-Iba1 en la CFN-CCG. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

4.4.2.2 Número de células Iba-1+ de la CPI, la CPE y de la CFR

El análisis manual y automático de las **células Iba-1+ de la CPI y de la CPE** que se llevó a cabo para validar el método desarrollado en MATLAB® (Figura 4.32), mostró una estrecha correlación entre ambas maniobras tanto en la CPE (Figura 4.33) como en la CPI (Figura 4.34), lo que otorgaba **fiabilidad** al **nuevo algoritmo** ($R=0,9797$, $P<0,001$ para la CPE y $R=0,9417$, $P<0,001$ para la CPI, Correlación de Pearson).

	Contaje celular Iba-1+ manual vs. automático											
	Control				Contralateral				HTO			
	n=20				n=20				n=20			
	CPE		CPI		CPE		CPI		CPE		CPI	
	AI	M	AI	M	AI	M	AI	M	AI	M	AI	M
Media	17,6	16,5	12,1	11,6	21,2	20,5	16,6	15,2	36,8	38,9	25,6	27,9
DT	4,5	4,1	4,2	4,4	3,9	3,8	3,9	3,6	10	9,6	6,3	7,5
Diferencia	1,1		0,5		0,7		1,4		2,1		2,3	
	Correlación de Pearson											
	CPE						CPI					
	0,9797						0,9417					
	<0,001						<0,001					

Figura 4.32. Validación del algoritmo automático desarrollado en Matlab para el conteo del número de células Iba-1+. Valores promedio y desviación estándar del número de células Iba-1+ contabilizadas manual y automáticamente en la CPE y en la CPI. Correlación de Pearson entre ambas maniobras de conteo celular. [AI: algoritmo; M: manual].

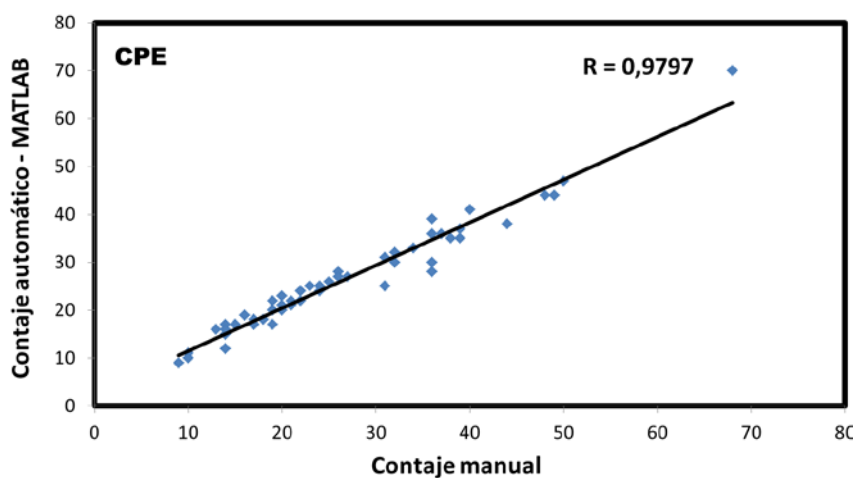


Figura 4.33. Validación del método automático de conteo celular Iba-1+ para la CPE. Correlación de Pearson entre la maniobra de conteo manual y automatizada.

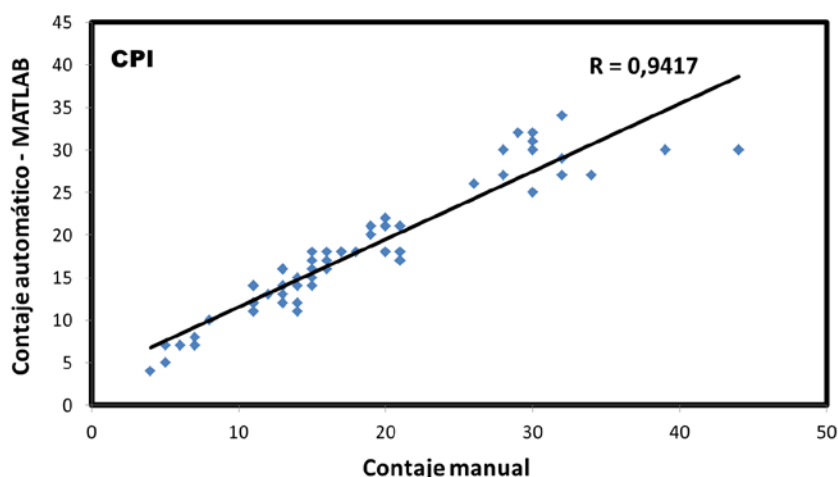


Figura 4.34. Validación del método automático de conteo celular Iba-1+ para la CPI. Correlación de Pearson entre la maniobra de conteo manual y automatizada.

Una vez validado el método, el **conteo automatizado de las células Iba-1+ de la CPI** en los ojos-HTO ($30,80 \pm 3,18$), mostró un **incremento** significativo de estas células respecto a las observadas en los ojos contralaterales ($18,43 \pm 2,52$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y en los animales del grupo control ($15,88 \pm 1,73$) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.35). Además, en los ojos contralaterales se observaba un mayor número de células Iba-1+ que en el grupo control ($P < 0,05$, prueba-t no pareada) (Figura 4.36).

Número de células Iba-1+ en la CPI			
	Control	Contralateral	HTO
Media	15,88	18,43	30,80
DT	1,73	2,52	3,18
P	<0,05		
		<0,001	
	<0,001		<0,001

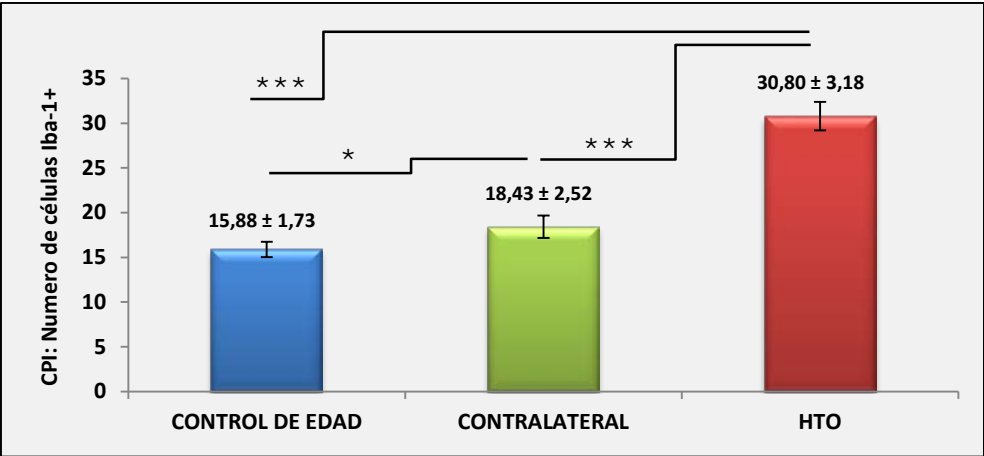


Figura 4.35. Número de células Iba-1+ de la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

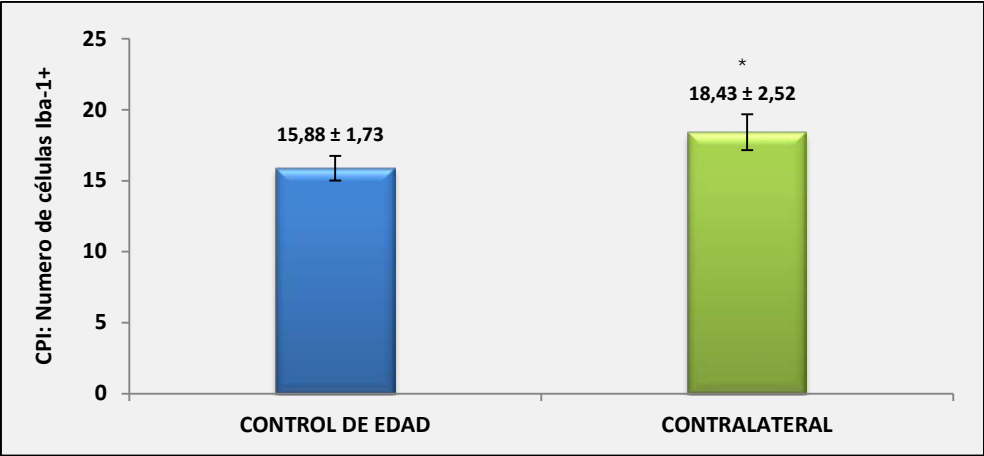


Figura 4.36. Número de células Iba-1+ de la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

El *contaje automatizado de las células Iba-1+ de la CPE* en los ojos-HTO mostró un *incremento* significativo ($34,81 \pm 2,83$) del número de células en comparación tanto con los ojos contralaterales ($22,36 \pm 2,57$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) como con los animales del grupo control ($20,00 \pm 2,31$) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.37).

Número de células Iba-1+ en la CPE			
	Control	Contralateral	HTO
Media	20,00	22,36	34,81
DT	2,31	2,57	2,83
P	<0,001		
	<0,001		<0,001

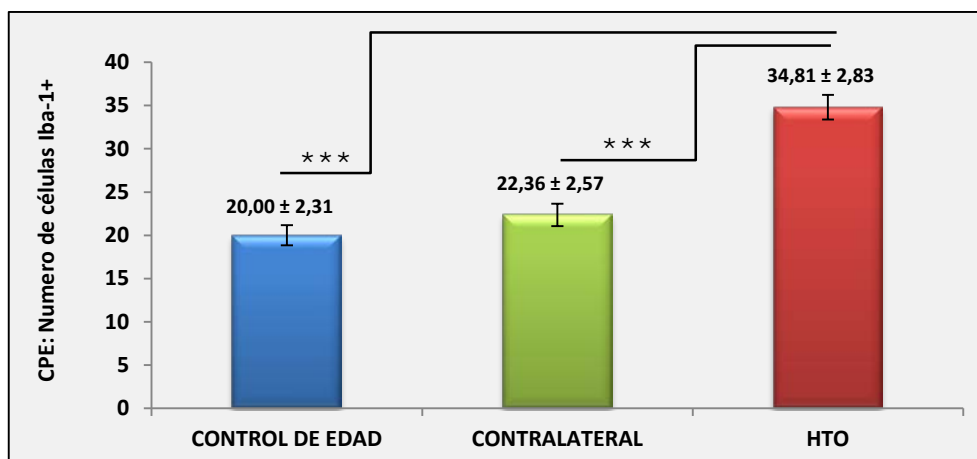


Figura 4.37. Número de células Iba-1+ de la CPE. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

En todos los ojos de estudio el mosaico celular Iba-1+ formado en la CPE era más denso que el encontrado en la CPI ($P < 0,01$ grupo control, $P < 0,001$ ojos contralaterales, $P < 0,001$ ojos-HTO, prueba-t pareada en todos los casos) (Figura 4.38).

	Número de células Iba-1+ en la CPE-CPI					
	Control		Contralateral		HTO	
	CPI	CPE	CPI	CPE	CPI	CPE
Media	15,88	20,00	18,43	22,36	30,80	34,81
DT	1,73	2,31	2,52	2,57	3,18	2,83
P	<0,01		<0,001		<0,001	

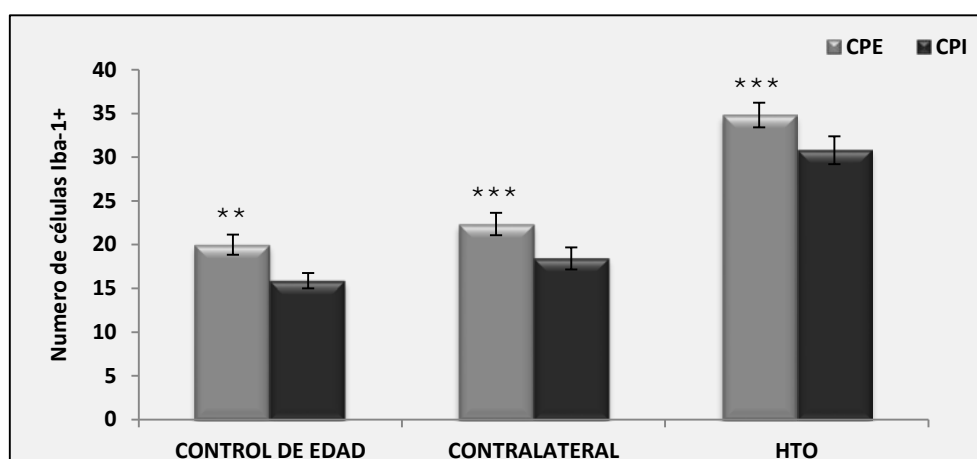


Figura 4.38. Número de células Iba-1+ de la CPE y de la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

El **número de células Iba-1+ de la CFR** en los ojos-HTO ($8,80 \pm 2,86$) era **mayor** al encontrado en los ojos contralaterales ($3,35 \pm 2,17$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y al de los ojos del grupo control ($1,44 \pm 0,75$) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.39).

Número de células Iba-1+ en la CFR			
	Control	Contralateral	HTO
Media	1,44	3,35	8,80
DT	0,75	2,17	2,86
P	<0,001		
	<0,001		<0,001

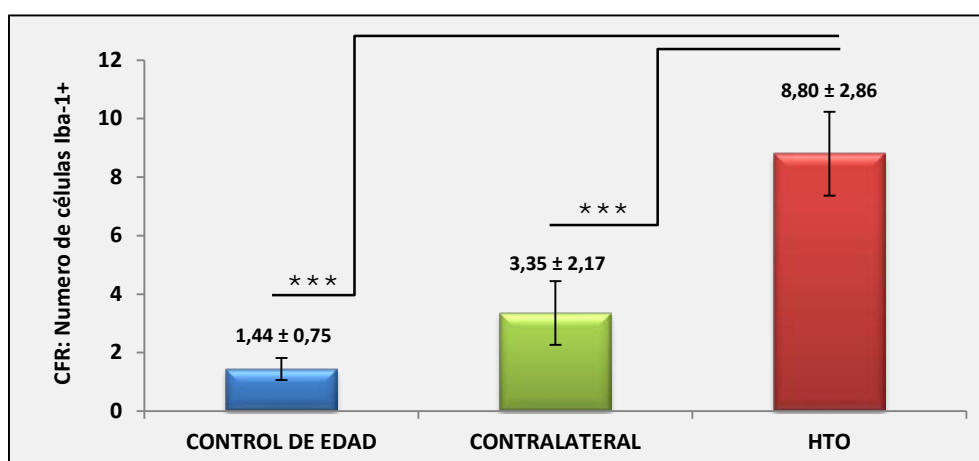


Figura 4.39. Número de células Iba-1+ de la CFR. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

El análisis del **número global de células Iba-1+ de la retina** (CPI, CPE y CFR), mostraba que comparativamente con el grupo control ($37,31 \pm 3,68$), los ojos contralaterales ($44,14 \pm 5,35$) y los ojos-HTO ($74,42 \pm 6,55$) experimentaban un **incremento** de la densidad celular ($P < 0,05$ ojos contralaterales y $P < 0,001$ ojos-HTO, prueba-t no pareada en ambos casos) (Figura 4.40 y Figura 4.41), siendo el número de células de los últimos mayor a la de los ojos contralaterales ($P < 0,001$, prueba-t pareada) (Figura 4.40).

Número de células Iba-1+ en CPI + CPE + CFR			
	Control	Contralateral	HTO
Media	37,31	44,14	74,42
DT	3,68	5,35	6,55
P	0,05		
			<0,001
	<0,001		<0,001

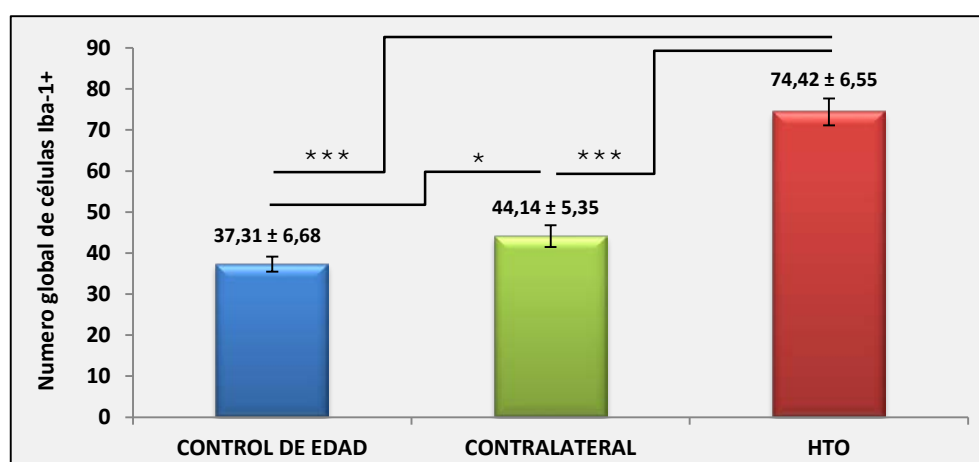


Figura 4.40. Número global de células Iba-1+ de la retina (CPI, CPE, CFR). Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

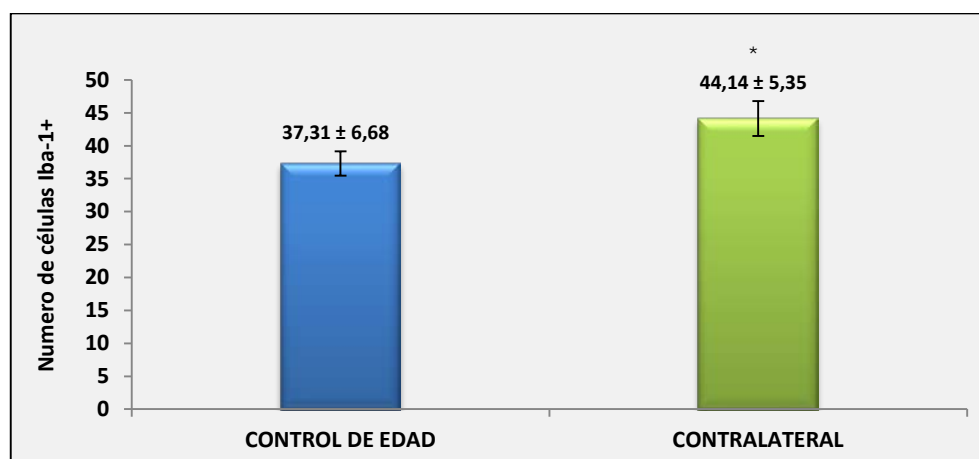


Figura 4.41. Número global de células Iba-1+ de la retina (CPI, CPE, CFR). Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

4.4.2.3 Dominios espaciales de las células Iba-1+

El promedio del **área que cada célula Iba-1+ ocupaba en la CPI** estaba **reducida** en los ojos-HTO ($3868,80 \pm 477,14$) respecto a las observaciones de los ojos contralaterales ($5545,96 \pm 288,80$) ($P < 0,001$, prueba-t pareada) y de los ojos del grupo control ($6318,65 \pm 319,17$) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.42). Curiosamente, en los ojos contralaterales las células Iba-1+ también ocupaban un área menor en comparación al del grupo control ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.43).

Dominios espaciales de las células Iba-1+ de la CPI			
	Control	Contralateral	HTO
Media	6318,65	5545,96	3868,80
DT	319,17	288,80	477,14
p	<0,001		
		<0,001	
	<0,001		<0,001

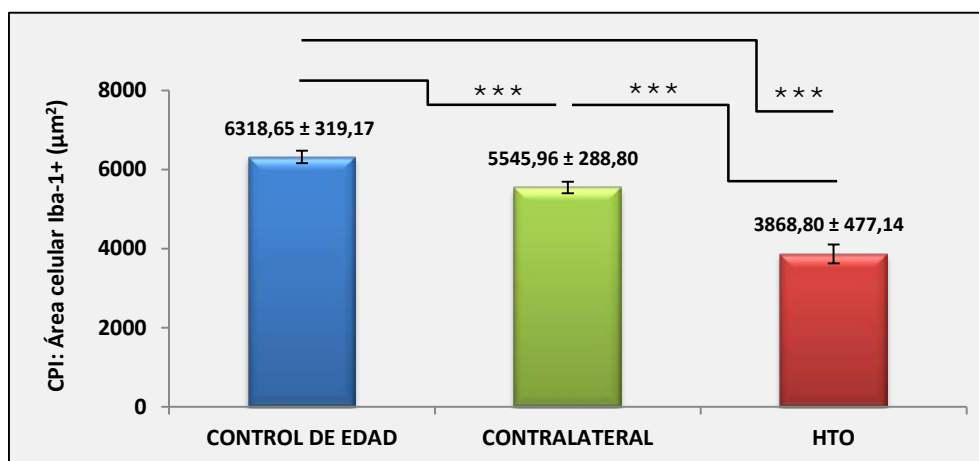


Figura 4.42. Dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

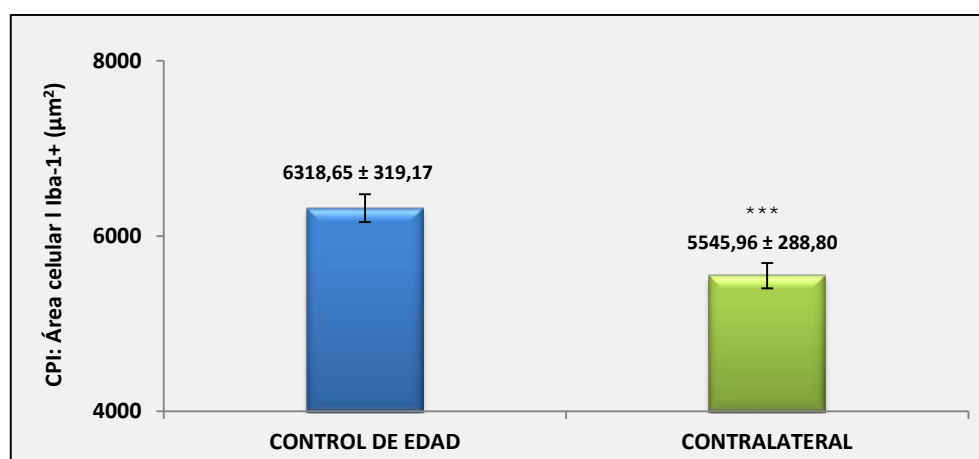


Figura 4.43. Dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

De la misma forma, el promedio del **área que cada célula Iba-1+ ocupaba en la CPE** en los ojos-HTO (3492,75 ± 766,85) era **menor** a la de los ojos contralaterales (5473,82 ± 1023,67) ($P < 0,01$, prueba-t pareada) y a la de los ojos del grupo control (7031,81 ± 1238,39) ($P < 0,001$, prueba-t no pareada) (Figura 4.44). Curiosamente, en los ojos contralaterales las células Iba-1+ también ocupaban un área menor en comparación con el grupo control ($P < 0,05$, prueba-t no pareada) (Figura 4.45).

Dominios espaciales de las células Iba-1+ de la CPE			
	Control	Contralateral	HTO
Media	7031,81	5473,82	3492,75
DT	1238,39	1023,67	766,85
P	<0,05		
	<0,01		
	<0,001		<0,001

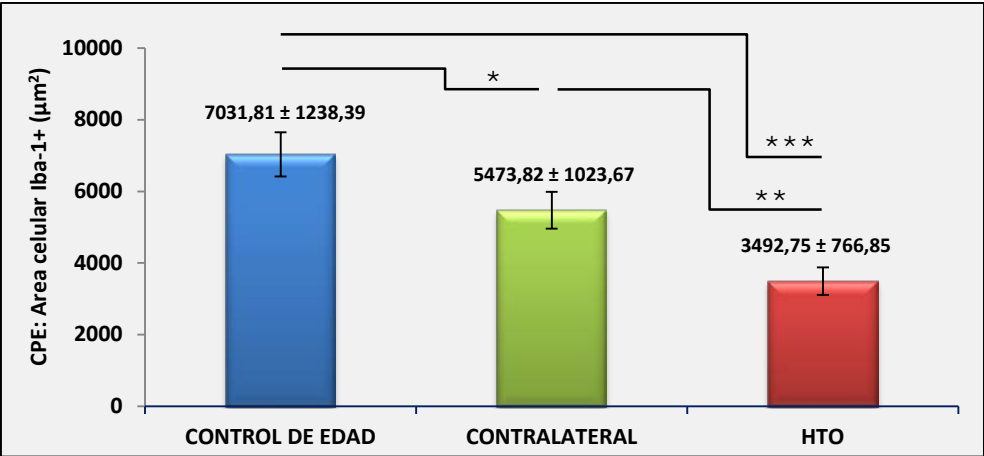


Figura 4.44. Dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPE. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles, contralaterales e HTO.

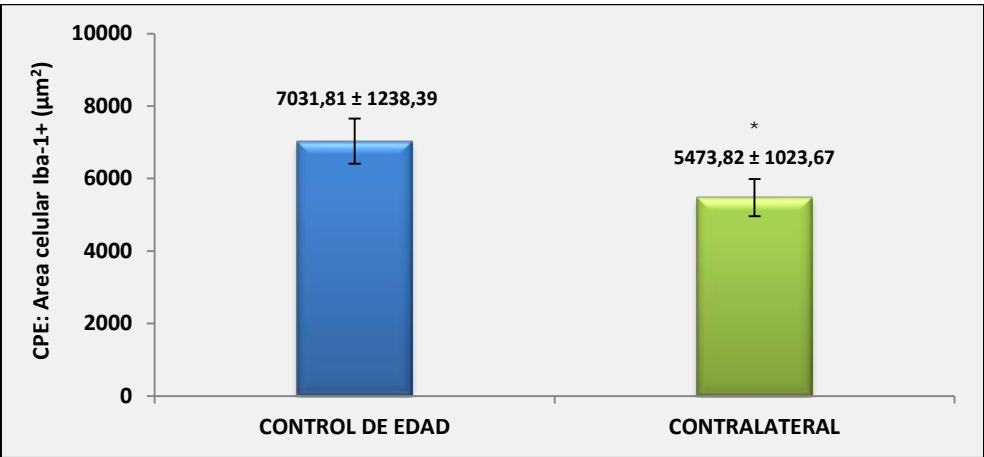


Figura 4.45. Dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPE. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

En todos los ojos de estudio, el área ocupada por cada célula Iba-1+ en la CPI no difería de los valores observados en la CPE (prueba-t pareada) (Figura 4.46).

Dominios espaciales de las células Iba-1+ de la CPI y CPE						
	Control		Contralateral		HTO	
	CPI	CPE	CPI	CPE	CPI	CPE
Media	6318,65	7031,81	5545,96	5473,82	3868,80	3492,75
DT	319,17	1238,39	288,80	1023,67	477,14	766,85
P	0,22		0,84		0,11	

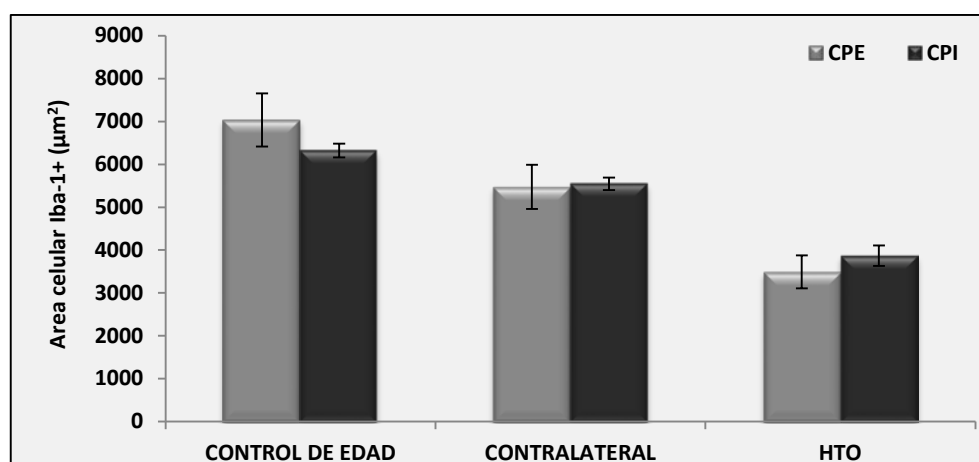


Figura 4.46. Dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPE y en la CPI. Valores medios y desviación estándar de los ojos controles y contralaterales.

El ratio o la razón geométrica de la variación del área ocupada por cada célula Iba-1+ entre los diferentes ojos de estudio mostró que las modificaciones que sufrían las células en la CPE eran más bruscas que en la CPI (Figura 4.47).

Variaciones de los dominios espaciales de las células Iba-1+						
Control vs. contralateral		Contralateral vs. HTO		Control vs. HTO		
	CPI	CPE	CPI	CPE	CPI	CPE
RATIO	1,14	1,28	1,43	1,57	1,63	2,01

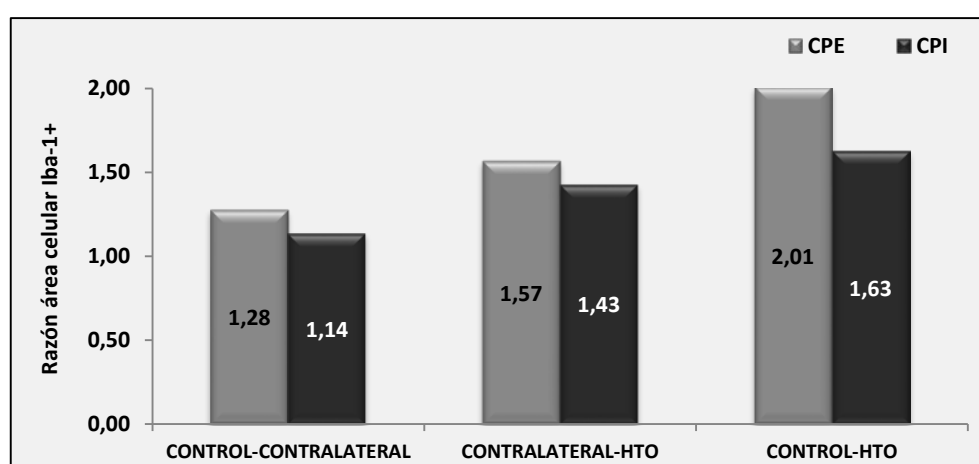


Figura 4.47. Variación del dominio espacial de las células Iba-1+ en la CPE y en la CPI. Razón geométrica entre los diferentes ojos de estudio.

4.4.3 Inmunorreacción CD68+ en las células Iba-1+

4.4.3.1 Grupo control de edad

En estos ojos, el inmunomarcaje del CD68+ que se observaba en las células Iba-1+ variaba dependiendo del estrato retiniano analizado.

Esporádicamente, en las células Iba-1+ de la CFN-CCG, CPI, CNI y CPE, aparecía un inmunomarcaje CD68+ puntiforme **disperso** por el citoplasma de algunos somas de estas células. A diferencia de esto, en la CFR la gran mayoría de las células con somas ovoideos presentaban una inmunorreacción CD68+ a modo de parches en el cuerpo celular (Figura 4.48 A-B y Figura 4.54), patrón que se observaba tan sólo en algunas de las células Iba-1+ con somas alargados de esta capa.

4.4.3.2 Ojos contralaterales no tratados

En general, el patrón del inmunomarcaje CD68+ que aparecía en estos ojos era **similar** al observado en el grupo **control**. Sin embargo, las células Iba-1+ de aspecto ameboideo de la **CFR** (Figura 4.48 C-D y Figura 4.54) y de la **CFN-CCG** (Figura 4.49 A-B y Figura 4.54), y **esporádicamente** algunas células ramificadas Iba-1+ de la **CPI** tenían una expresión CD68+ localizada en sus somas a modo de **parches**.

4.4.3.3 Ojos-HTO

En este grupo la **mayoría de las células Iba-1+** de la retina tenía un inmunomarcaje **CD68+**. Éste podía localizarse tanto en el soma como en las prolongaciones, pudiendo ser punteado o presentarse a modo de parches densos (Figura 4.48 E-H, Figura 4.49 C-H y Figura 4.50).

La **CFN-CCG** eran las que tenían un **mayor inmunomarcaje CD68+**. Las células de aspecto **ameboideo** y las células **redondeadas** Iba-1+ (Figura 4.49 C-F y Figura 4.54) tenían amplias zonas a modo de **parches CD68+** que cubrían la mayor parte de la célula.

En la CFN-CCG todas las **células Iba-1+ en bastón** presentaban un inmunomarcaje CD68+. Ésta variaba de ser una expresión punteada, a observarse formando grandes

parches que ocupaban la mayor parte de la célula (Figura 4.49 G-H, Figura 4.50 y Figura 4.54). Teniendo en cuenta la apariencia morfológica de las células Iba-1+, estos patrones de **expresión variable** del CD68 parecían corresponderse con diferentes niveles de activación celular. Así, se observaba un primer estadio en el que las células Iba-1+ en bastón tenían un soma alargado con largas prolongaciones celulares y que presentaban un intenso **marcaje punteado CD68+** (Figura 4.50 A1-A3). En un segundo estadio, se encontraban unas células Iba-1+ en bastón que había experimentado una retracción y un ensanchamiento de sus prolongaciones y que característicamente tenían una expresión CD68+ distribuida en la célula **a modo de parches** (Figura 4.50 B1-B3). Finalmente, un tercer estadio reunía a unas células Iba-1+ en bastón con somas rechonchos y unas prolongaciones cortas y gruesas. En estas últimas, el inmunomarcaje CD68+ ocupaba **gran parte** del **citoplasma** celular (Figura 4.50 C1-C3).

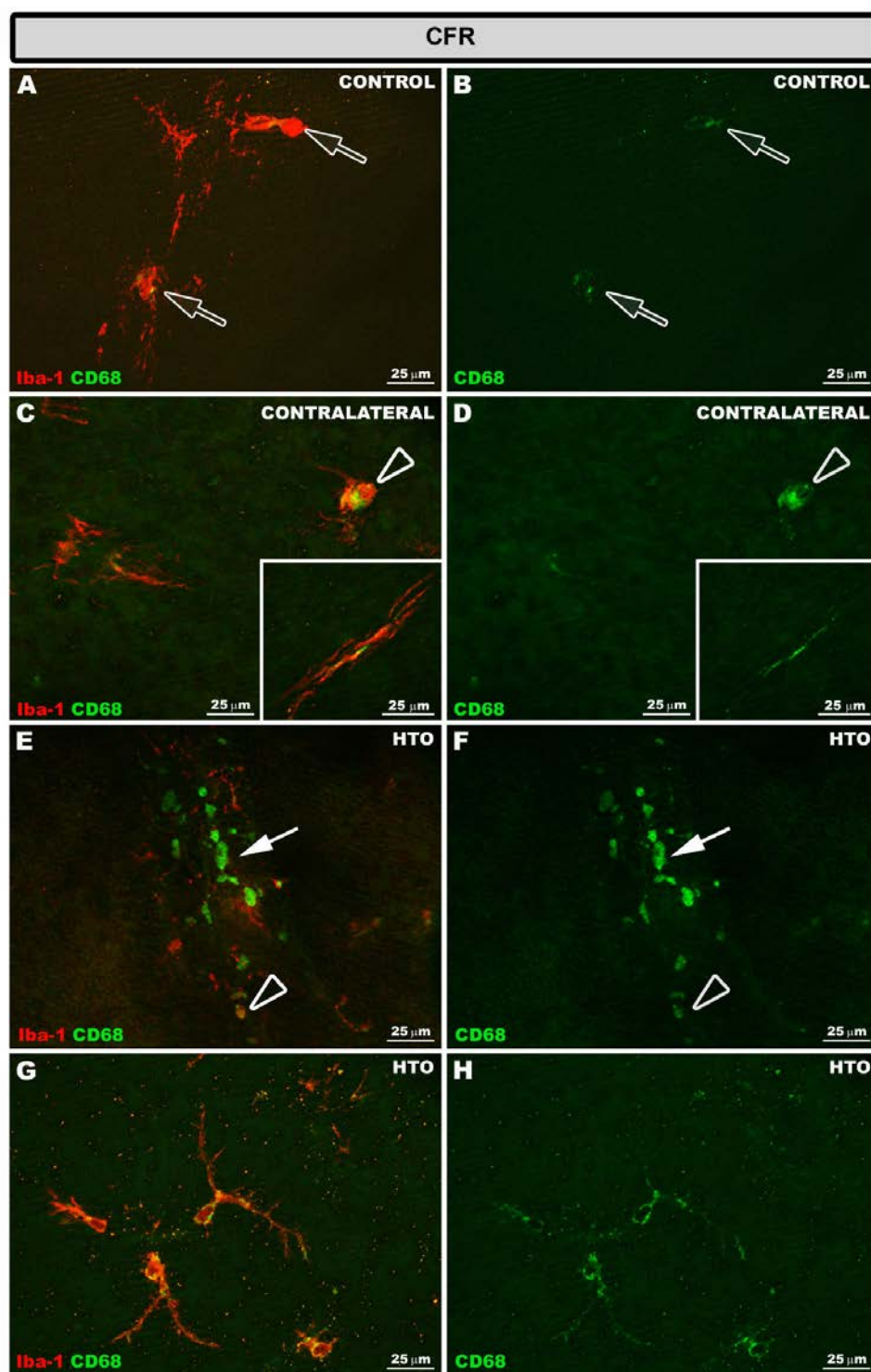


Figura 4.48. Expresión de CD68 en las células Iba-1+ de la CFR. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y CD68 (verde). Montaje plano de retina. En los ojos del grupo control (A-B) la mayoría de las células Iba-1+ de somas ovoideos presentaban un inmunomarcaje CD68+ (flecha hueca). En los ojos contralaterales (C-D) las células Iba-1+ de aspecto ameboideo (cabeza de flecha hueca) también tenían un intenso inmunomarcaje CD68+. En los ojos-HTO (E-H) existía un intenso marcaje CD68+ en las células Iba-1 tanto de aspecto ameboideo (cabeza de flecha hueca en E-F) como redondeado (flecha en E-F), y en los somas y prolongaciones de las células de apariencia alargada de esta capa (G-H). [CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

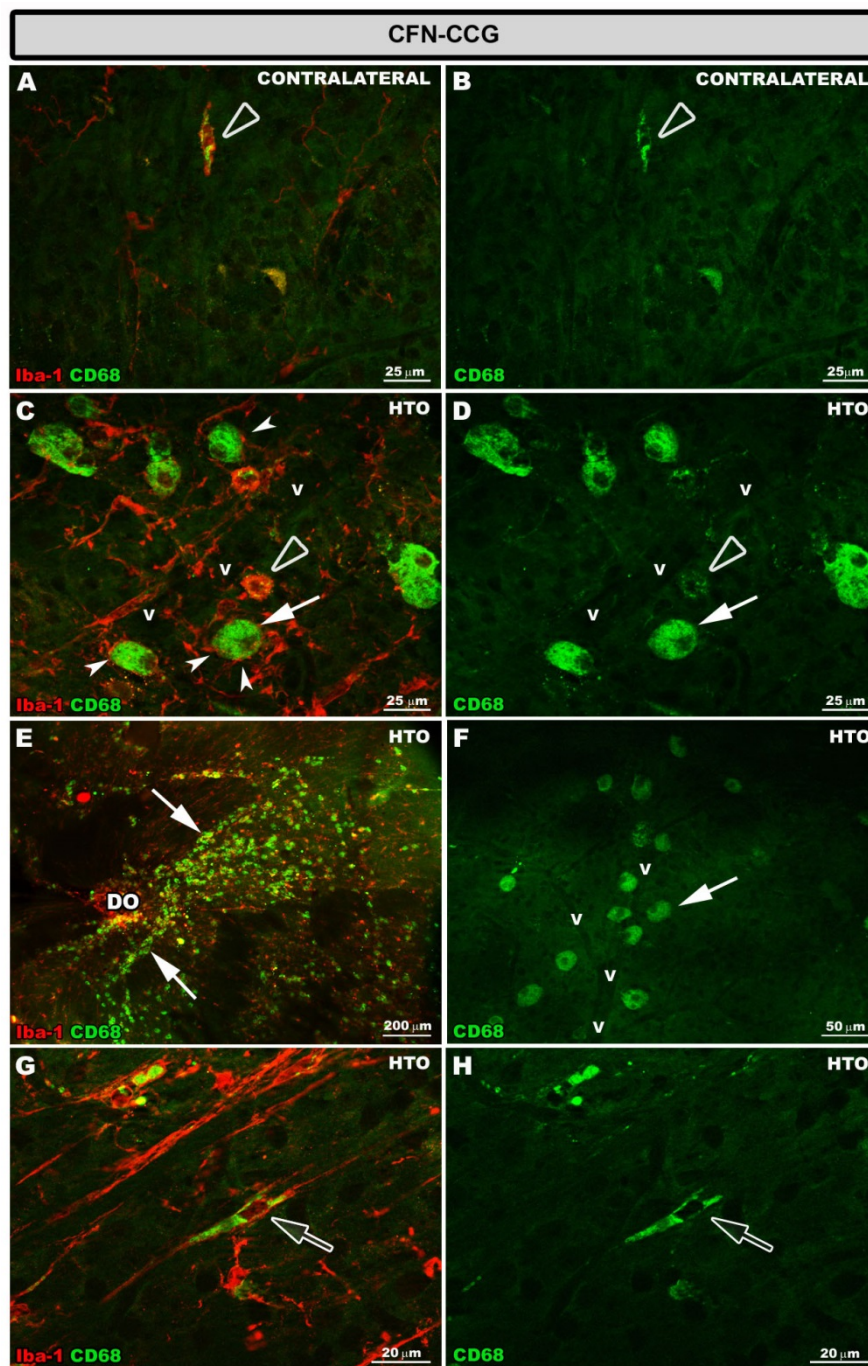


Figura 4.49. Expresión de CD68 en las células Iba-1+ de la CFN-CCG. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y CD68 (verde). Montaje plano de retina. En los ojos contralaterales (A-B) el inmunomarcaje CD68+ sólo aparecía en forma de parches en algunas células Iba-1+ de apariencia ameboidea (punta de flecha hueca). Sin embargo, en los ojos-HTO (C-H), éstas (punta de flecha hueca en C-D) y algunas células Iba-1+ en bastón (flecha hueca en E-F) tenían un inmunomarcaje CD68+ notable. Las células redondeadas (flecha en C-F) que se localizaban adyacentes los vasos (C-D, F), preferentemente en las proximidades del disco óptico (E), presentaban también una intensa expresión CD68+ y en ocasiones estaban rodeadas por las prolongaciones de las células Iba-1+ ramificadas de esta capa (cabeza de flecha en C) [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; HTO: hipertensión ocular; v: vaso sanguíneo; DO: disco óptico].

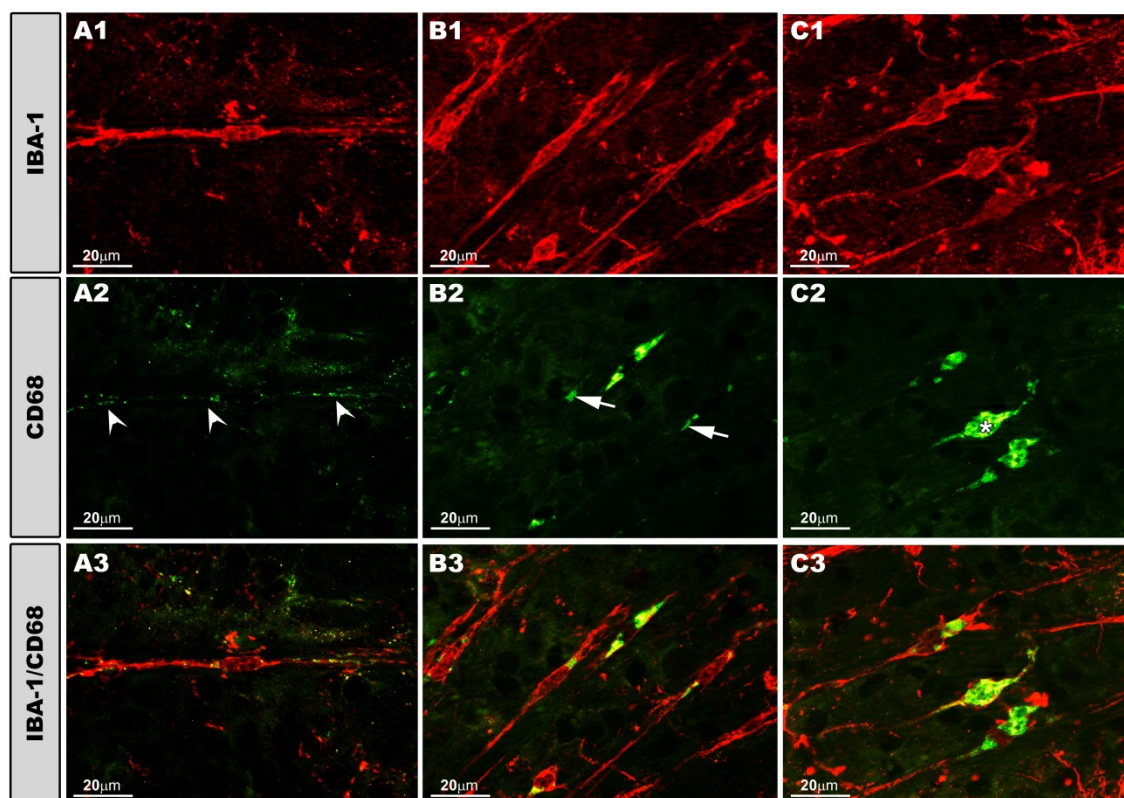


Figura 4.50. Diferentes patrones de expresión CD68+ en las células Iba-1+ en bastón de la CFN-CCG. Inmunofluorescencia Iba-1 (rojo) y CD68 (verde). Montaje plano de retina. Considerando la apariencia morfológica de las células Iba 1+ y los diferentes patrones de inmunomarcaje CD68+ podían diferenciarse: unas células Iba 1+ en bastón con un soma alargado, largas prolongaciones celulares y un intenso marcaje punteado CD68+ (A1-A3). Unas células Iba 1+ en bastón con unas prolongaciones celulares retraídas y ensanchadas con una expresión CD68+ distribuida en la célula a modo de parches (B1-B3). Y unas células Iba 1+ en bastón con somas fusiformes gruesos con unas prolongaciones cortas y gruesas donde el inmunomarcaje CD68+ ocupaba gran parte de su citoplasma.

4.5 Expresión del MHC-II en las células gliales de la retina

4.5.1 Grupo control de edad

Los **astrocitos GFAP+** presentaban una expresión **constitutiva** muy sutil de las moléculas del MHC-II (Figura 4.51 A1-A3), no observándose ésta en las células de Müller.

La mayoría de las **células Iba-1+** tenían una expresión **débil constitutiva** de las moléculas del MHC-II (Figura 4.52 A, D, G, J y Figura 4.54). Sin embargo, todas las células de **aspecto dendritiforme Iba-1+** de la CPI (Figura 4.52 G y Figura 4.54), y algunas de las células perivasculares Iba-1+ de la CFN-CCG, mostraban un **intenso** marcaje MHC-II+.

4.5.2 Ojos contralaterales no tratados

En general, todos los **astrocitos GFAP+** de estos ojos experimentaron un **incremento** del inmunomarcaje MHC-II+ en relación al grupo control. En algunas zonas aisladas de la retina las **células de Müller GFAP+** también presentaban dicho marcaje (Figura 4.51 B1-B3 y Figura 4.53 A1-A3).

Todas las **células Iba-1+** de los ojos contralaterales mostraban un **incremento** de la inmunorreactividad MHC-II+ en comparación con los resultados del grupo control (Figura 4.52 B, E, H, K y Figura 4.54).

4.5.3 Ojos-HTO

En los ojos-HTO **desaparecía** la presencia de inmunorreactividad MHC-II+ **en los astrocitos GFAP+**, sin embargo las **células de Müller incrementaron** notablemente su inmunomarcaje por toda la retina (Figura 4.51 C1-C3), marcándose preferentemente sus pies terminales (Figura 4.53 B1-B3).

La expresión del MHC-II en todas las **células Iba-1+** de estos ojos era **similar** a la observada en los ojos **contralaterales**. (Figura 4.20, Figura 4.52 C, F, I, L y Figura 4.54).

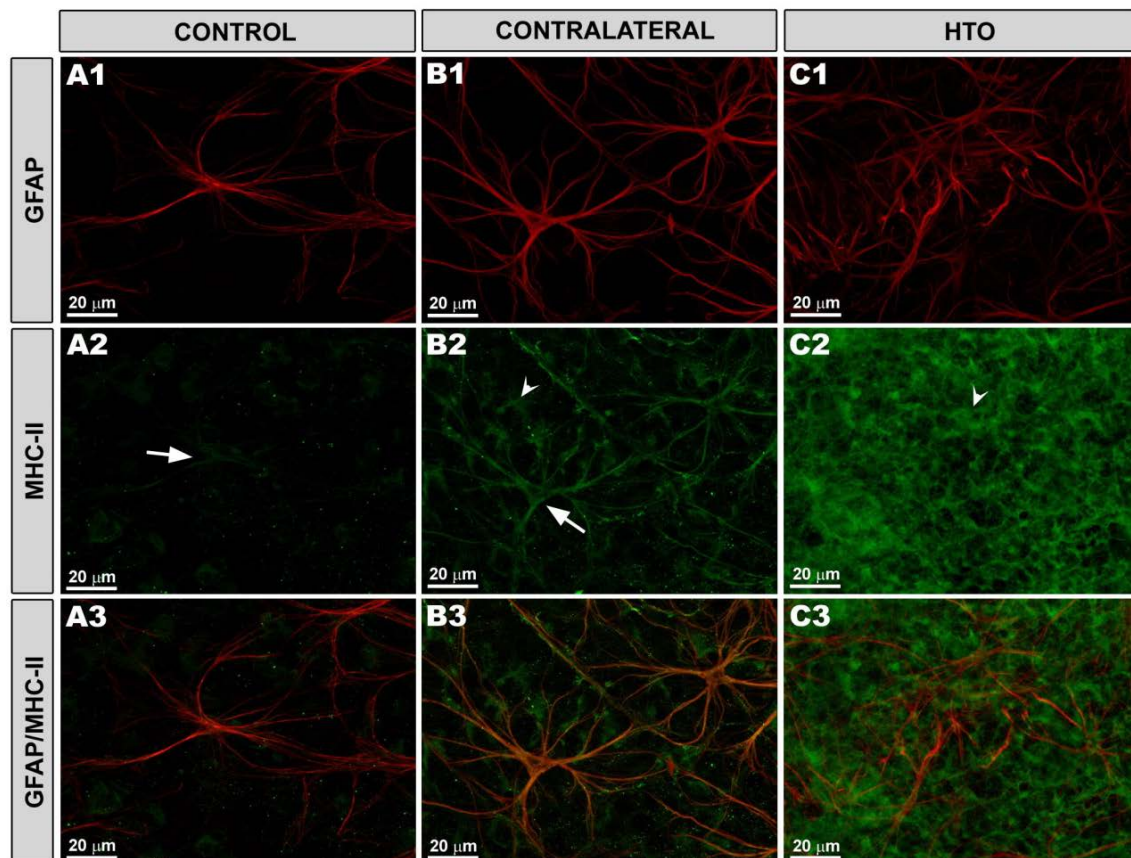


Figura 4.51. Expresión del MHC-II en los astrocitos y en las células de Müller GFAP+ de la retina. Inmunofluorescencia GFAP (rojo) y MHC-II (verde). Montaje plano de retina. En los ojos del grupo control (**A1-A3**) sólo algunos astrocitos GFAP+ presentaban un ligero inmunomarcaje MHC-II+ (flecha en **A2**). Sin embargo, tras la inducción de la HTO, en los ojos contralaterales (**B1-B3**) tanto los astrocitos GFAP+ (flecha en **B2**) como las células de Müller GFAP+ (cabeza de flecha en **B2**) experimentaban un incremento de la expresión del MHC-II. En los ojos-HTO (**C1-C3**) la expresión del MHC-II se acentuaba notablemente en las células de Müller GFAP+ (cabeza de flecha en **C2**), no observándose, a diferencia de los ojos contralaterales, astrocitos GFAP+/MHC-II+.

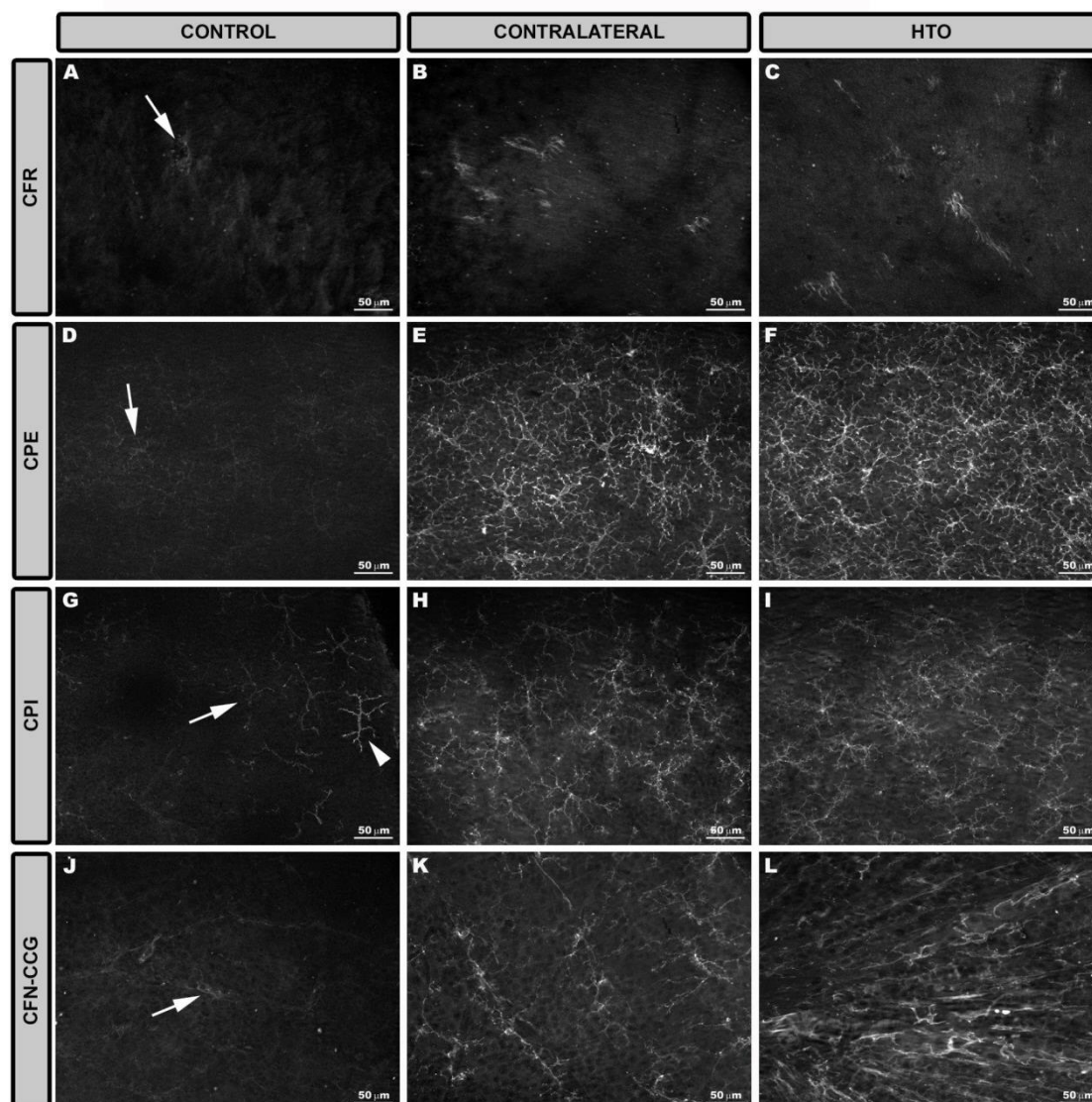


Figura 4.52. Expresión de MHC-II por las células Iba-1+ en las diferentes capas de la retina. Inmunofluorescencia MHC-II. Montaje plano de retina. En los ojos del grupo control (A, D, G, J), las células Iba-1+ de toda la retina mostraban en general un tenue inmunomarcaje constitutivo MHC-II+ (flecha). Sin embargo, en estos ojos las células Iba-1+ de aspecto dendritiforme de la CPI (cabeza de flecha en G) tenían un marcaje constitutivo intenso. De manera secundaria a la HTO, la expresión del MHC-II en las células Iba-1+ de toda la retina aumentaba tanto en los ojos contralaterales (B, E, H, K) como en los ojos-HTO (C, F, I, L). [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa; CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular].

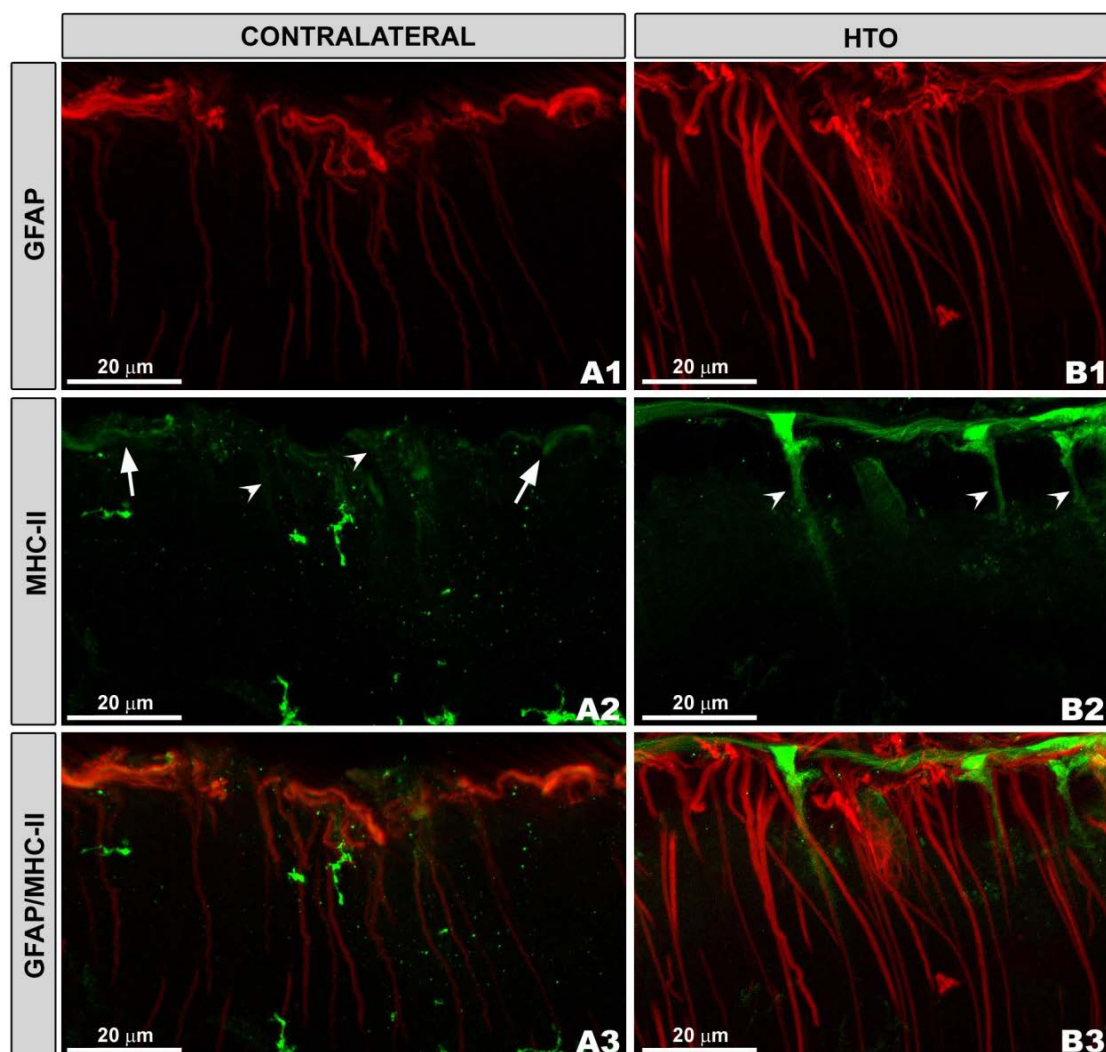


Figura 4.53. Expresión del MHC-II en los astrocitos y en las células de Müller GFAP+ de la retina. Inmunofluorescencia GFAP (rojo) y MHC-II (verde). Montaje plano de retina. Imagen semejante a una sección histológica transversal proporcionada por la presión ejercida por el cubreobjetos en el borde del tejido. Las células de Müller de los ojos-HTO (**B1-B3**) tenían una IR-GFAP más notable que la observada en los ojos contralaterales (**A1-A3**). La expresión del MHC-II en los ojos contralaterales, aparecía predominantemente en los astrocitos GFAP+ (flecha en **A2**) y sólo se observaba de manera sutil en algunas células de Müller GFAP+ (cabeza de flecha en **A2**). Sin embargo, en los ojos-HTO (**B1-B3**) la expresión de las moléculas del MHC-II incrementaba en la glía de Müller (cabeza de flecha en **B2**), preferentemente en sus pies terminales, y de forma destacable disminuía o desaparecía la IR-GFAP en estas células de Müller MHC-II+. [HTO: hipertensión ocular].

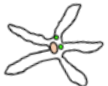














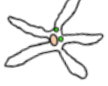
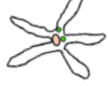











CAPA	MORFOLOGÍA	CD68			MHC-II		
		CONTROL	CONTRALATERAL	HTO	CONTROL	CONTRALATERAL	HTO
CFN-CCG	Ramificada				C	SB	SB
	Perivascular				C	SB	SB
	Amoebóidea					+	+
	Redondeada						+
	Bastón						+
CPI	Ramificada				C	SB	SB
	Dendritiforme				C	C	C
CPE	Ramificada				C	SB	SB
CFR	Somas ovoideos				C	SB	SB
	Alargada				C	SB	SB
	Amoebóidea					+	+
	Redondeada						+
	Dendritiforme						+

Figura 4.54. Patrones de expresión de los marcadores de reactivación celular Iba-1+: CD68 y MHC-II. El esquema recoge los diferentes patrones de inmunomarcaje CD68+ (verde) y el perfil de expresión del MHC-II en todos los tipos morfológicos de células Iba-1+ observadas en las capas de la retina de los ojos controles, contralaterales e HTO. [CFN-CCG: capa de fibras del nervio óptico-capa de células ganglionares; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa; CFR: capa de fotorreceptores; HTO: hipertensión ocular; c: expresión constitutiva débil; C: expresión constitutiva intensa; SB: incremento de la expresión; +: presencia de inmunomarcaje].

Discusión

5 Discusión

5.1 Modelo de hipertensión ocular. Ratón albino Swiss

Los roedores han sido empleado de forma rutinaria en la experimentación animal debido a su bajo coste y a la sencillez de su manejo (*Peters et al. 2007*). El ratón además, gracias al conocimiento de su genoma, posee una ventaja añadida, la posibilidad de ser manipulado genéticamente (*McKinnon et al. 2009, Peters et al. 2007*). Todo esto sumado a la similitud de sus retinas con la humana, ha promovido su uso creciente para el estudio de ciertas enfermedades, entre ellas la neuropatía óptica glaucomatosa (*Howell et al. 2008, Johnson and Tomarev 2010*).

El aumento de la PIO, es uno de los principales factores de riesgo de la neuropatía óptica glaucomatosa, siendo hoy en día el mecanismo más empleado para el desarrollo de modelos experimentales. Además de los modelos congénitos, como son los ratones de la línea DBA/2J (*Bayer et al. 2001, Buckingham et al. 2008, Filippopoulos et al. 2006, Howell et al. 2007, Jakobs et al. 2005, Libby et al. 2005a, Schlamp et al. 2006, Soto et al. 2008*), existen múltiples metodologías experimentales capaces de reproducir la elevación aguda de la PIO en los ratones; entre ellas destacan la fotocoagulación de la malla trabecular (*Grozdanic et al. 2003a*) la inyección de suero salino en las venas episclerales (*Kipfer-Kauer et al. 2010, McKinnon et al. 2003*), o la fotocoagulación láser de las venas episclerales y/o perilimbares (*Cuenca et al. 2010, Gross et al. 2003, Grozdanic et al. 2003a, Ruiz-Ederra and Verkman 2006, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008*).

Los modelos de HTO difieren entre sí en los valores de PIO obtenidos, el momento en el cual ésta alcanza su pico máximo y el tiempo que se mantiene elevada. Estos cambios, no sólo parecen ser dependientes de la técnica empleada, sino también, de la especie en la que se desarrolla el modelo (*Chauhan et al. 2002, Cone et al. 2010, John et al. 1997, Savinova et al. 2001*). Existe una gran cantidad de trabajos en ratones pigmentados, tanto en modelos congénitos de glaucoma (*John et al. 1998, Libby et al. 2005a*), como en modelos no congénitos (*Aihara et al. 2003a, Aihara et al. 2003b, Grozdanic et al. 2003a, Holcombe et al. 2008, Mabuchi et al. 2004, Ruiz-Ederra and Verkman 2006*). Sin embargo, tan sólo una pequeña parte de la investigación se

ha desarrollado en ratones albinos (Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a, Valiente-Soriano et al. 2008). Nuestro modelo de glaucoma en el ratón albino Swiss mediante fotocoagulación láser de las venas episclerales y perilimbaires, presentaba un incremento brusco de la PIO en las primeras 24 horas, que se mantenía estable durante aproximadamente 5 días tras el tratamiento láser. Este incremento de la PIO se observó de manera consistente en todos nuestros animales, siendo por tanto la fotocoagulación de las venas episclerales y perilimbaires un método fiable y reproducible para el desarrollo de HTO.

Sin desestimar que actualmente ningún modelo de glaucoma es capaz de reproducir a la perfección las características del glaucoma crónico simple, el hecho de que nuestro modelo presentase un incremento agudo pero breve de la PIO, podría verse como una desventaja respecto a otros modelos que tratan de mimetizar la cronicidad de la patología glaucomatosa humana (Morrison 2005). Sin embargo, a pesar de estas diferencias Salinas-Navarro y cols. (Salinas-Navarro et al. 2009a) documentaron en el mismo modelo de nuestro estudio, la presencia de alteraciones electroretinográficas permanentes en la respuesta umbral escotópica, la amplitud de la “onda a” así como de la “onda b”, asociado con la afectación de las CGRs, los fotorreceptores, y las células bipolares respectivamente. Todo esto está ligado a un daño severo de la retina, hecho que se reproduce de manera clásica en la degeneración glaucomatosa, tanto en humanos como en modelos de HTO crónica (Buckingham et al. 2008, Bui and Fortune 2004, Chauhan et al. 2002, Filippopoulos et al. 2006, Fortune et al. 2004, Grozdanic et al. 2003a, Holcombe et al. 2008, Holopigian et al. 1990, Jakobs et al. 2005, Mehaffey et al. 1993, Schlamp et al. 2006, Soto et al. 2008, Vaegan et al. 1995). Además de estas alteraciones funcionales, nuestro modelo se sabe que presenta una afectación histológica de la CFN y el daño y muerte neuronal tanto de la retina interna como de la externa (Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a) de forma similar a lo observado en otros modelos crónicos de HTO (Fortune et al. 2004, Grozdanic et al. 2003a, Holcombe et al. 2008, Johnson and Tomarev 2010, Nagaraju et al. 2007, Pang and Clark 2007, Saleh et al. 2007, Weinreb and Lindsey 2005) así como en la patología glaucomatosa humana (Nork et al. 2000). Por lo tanto, debido a lo anteriormente expuesto, los resultados derivados de nuestro modelo de HTO podrían ser útiles para una mejor comprensión de la fisiopatología de la neuropatía óptica glaucomatosa humana.

5.2 Alteración de las células ganglionares de la retina: cambios del inmunomarcaje NF-200+

El incremento de la PIO puede provocar la pérdida axonal (*Chauhan et al. 2002, Levkovitch-Verbin et al. 2002b*) y la muerte incipiente por apoptosis de las CGRs (*Chauhan et al. 2002, Levkovitch-Verbin et al. 2002b, Morrison et al. 1997, WoldeMussie et al. 2001*). Coincidiendo con esto, un estudio de Salinas-Navarro y cols. en el que se empleaba el mismo modelo experimental de nuestro estudio (*Salinas-Navarro et al. 2009a*), mostró cómo el incremento de la PIO era consecuente con una pérdida de aproximadamente un 50% de CGRs Brn3a+ en la primera semana tras la inducción de la HTO. Esta pérdida se observaba de forma generalizada en la retina superior y sólo de manera sectorial en la retina inferior.

En nuestro modelo, la isquemia transitoria que sufre la retina tras el incremento de la PIO, podría ser la causa fundamental de la muerte de las CGRs. En este supuesto, un proceso isquémico generalizado, debería provocar también de manera generalizada una afectación de las CGRs. Sin embargo, ya hemos visto cómo la pérdida que se observaba en nuestros ratones con HTO tenía un carácter sectorial, desbancando a la isquemia como el mecanismo principal implicado en la muerte de las CGRs. Además, la degeneración neuronal observada en nuestro modelo de HTO tampoco seguía el típico patrón a parches de otros procesos isquémicos transitorios en la retina, lo que de nuevo apoyaba que la isquémica tendría una baja participación en esta neurodegeneración (*Aviles-Trigueros et al. 2003, Lafuente Lopez-Herrera et al. 2002, Lafuente et al. 2002, Mayor-Torroglosa et al. 2005*). Ya que el daño observado era sectorial y teniendo en cuenta que los axones en el nervio óptico presentan una organización retinotópica, podría ser que la compresión axonal a nivel de la cabeza del nervio óptico fuese la causa principal de la muerte de las CGRs en nuestro modelo de HTO (*Salinas-Navarro et al. 2009a, Salinas-Navarro et al. 2010*). Apoyando esta hipótesis, los estudios de Salinas-Navarro y cols. mostraron cómo el número de CGRs Brn3a+ era superior al número de células marcadas mediante trazadores tanto de transporte axonal retrógrado activo (OHTs o FG) como pasivo (DMTR), evidenciando de esta manera el bloqueo mecánico de los axones en la región del nervio óptico.

Por otro lado, se sabe que el incremento de la PIO produce además un fallo en el transporte axonal (Anderson and Hendrickson 1974, Mabuchi et al. 2004, Minckler et al. 1976, Pease et al. 2000, Quigley and Anderson 1977, Quigley et al. 1981), lo que provoca la disfunción y finalmente la muerte de las CGRs.

Un transporte axonal eficaz parece ser dependiente de modificaciones post-traslacionales y de la fosforilación de las unidades pesadas de los NFs (Lee and Cleveland 1996, Nixon and Sihag 1991, Pant and Veeranna 1995). Los NFs de 200 KDa del citoesqueleto de las neuronas en condiciones normales se encuentran localizados en los axones de las CGRs y en raras ocasiones en sus somas (Bizzi et al. 1991). De acuerdo con lo anterior, los ojos de nuestro grupo control y los contralaterales, ambos con valores normales de PIO, presentaban un inmunomarcaje NF-200+ principalmente en los axones de las CGRs y de manera esporádica en algún soma o dendrita proximal. Estas similitudes entre ambos ojos, evidenciaba la ausencia de neurodegeneración en los ojos contralaterales, lo cual se correlacionaba con los resultados de Salinas-Navarro y cols. (Salinas-Navarro et al. 2009a). Estos autores, haciendo uso de nuestro mismo modelo y de trazadores retrógrados aplicados en el colículo superior, observaron cómo el número y la distribución de las CGRs era similar en los ojos control y en los contralaterales (Salinas-Navarro et al. 2009a), hecho que corroboraba por un lado la ausencia de un fallo en el transporte axonal y por otro la muerte celular en los ojos contralaterales.

Sin embargo, se sabe que tras el incremento de la PIO se producen cambios en el metabolismo de los NFs, signo de un fallo en el transporte axonal; la mayor parte de las subunidades pesadas se defosforilan y existe una reorganización de éstos dentro de la neurona (Al-Chalabi and Miller 2003, Kashiwagi et al. 2003). Al respecto, en los ojos-HTO de nuestros ratones, aumentaba significativamente el número de CGRs con un inmunomarcaje NF-200+ localizado de manera anómala en el soma y en algunas dendritas proximales, lo que se correlacionaba con un proceso neurodegenerativo asociado a un fallo del transporte axonal. Esto parecía concordar con los estudios de Salinas-Navarro y cols., llevados a cabo en el mismo modelo experimental de nuestro trabajo (Salinas-Navarro et al. 2009a). Los autores observaban a la semana de la inducción de la HTO una muerte de CGRs

Brn3a+ de en torno a un 50%, que era aún mayor, 75-80%, al analizar las CGRs marcadas retrógradamente mediante OHTs. Debido a ello, se podría pensar que el bloqueo axonal mecánico a nivel de la cabeza del nervio óptico asociado a valores elevados de la PIO, podría en parte dar explicación a este hecho. Sin embargo, cuando los valores de PIO se normalizaban, la pérdida de CGRs OHTs+ documentada en la primera semana no variaba, mientras que el número de CGRs Brn3a+ descendía progresivamente. Todo esto parece apostar por la existencia de un fallo incipiente masivo del transporte axonal que podría ser consecuente con la muerte de las CGRs a largo plazo.

Tras un daño severo de los axones de las CGRs, como el que provoca la axotomía del nervio óptico, se produce una degeneración walleriana rápida de los axones distales (Conforti et al. 2007), que conduce a la muerte neuronal sin ninguna posibilidad de regeneración. Sin embargo, en lesiones axonales más leves o difusas, como ocurre mayoritariamente en el glaucoma, la degeneración celular se lleva a cabo mediante un proceso más lento conocido como “dying-back” o axonopatía distal retrógrada, que mantiene un cierto grado de interconexión entre las diferentes regiones celulares: soma, axón proximal, y regiones axonales más distales (Buckingham et al. 2008, Crish et al. 2010, Fu and Sretavan 2010, Howell et al. 2007, Schlamp et al. 2006, Whitmore et al. 2005). La presencia de CGRs NF-200+ podría apoyar este último tipo de degeneración lenta en el que las células, aunque con claros signos de afectación, podrían seguir manteniendo parcialmente sus mecanismos homeostáticos y presentar una oportunidad regenerativa (Soto et al. 2008, Soto et al. 2011). Sin embargo, este daño parcial de las CGRs parece exacerbarse posteriormente en nuestro modelo y conducir a la muerte celular, similar a lo que ocurre en otros modelos de HTO crónica o en la neuropatía óptica glaucomatosa humana (Salinas-Navarro et al. 2009a).

Por tanto, un incremento de la PIO en nuestro modelo es consecuente con una degeneración y muerte de las CGRs, que concuerda con la afectación electrofisiológica ya descrita (Salinas-Navarro et al. 2009a), el marcaje NF-200+ en los somas y las dendritas proximales de estas células y el perfil de muerte celular observado en la retina de este modelo de glaucoma en los ratones albinos Swiss (Salinas-Navarro et al. 2009a).

5.3 Cambios de la población glial de la retina ante el incremento de la presión intraocular

La glía históricamente ha sido considerada un elemento pasivo del sistema nervioso. Sin embargo, hoy en día se sabe que desempeña funciones necesarias para mantener el equilibrio homeostático del tejido, promoviendo así la funcionalidad y la supervivencia de las neuronas. Sin embargo, durante el envejecimiento o en condiciones patológicas, las células gliales experimentan cambios estructurales y funcionales, entre ellos la hipertrofia, la proliferación, la migración y la secreción de ciertas sustancias, todo ello conocido como reactivación glial (Raivich et al. 1999).

Para garantizar la supervivencia neuronal en el curso de diferentes patologías retinianas, es crucial que las células gliales sean capaces de responder rápidamente a cualquier tipo de daño y por tanto que se reactiven (Tezel et al. 2007). Durante la neurodegeneración glaucomatosa se sabe que las células gliales poseen una función importante en la supervivencia y/o muerte de las CGRs. Los estudios en humanos y en modelos animales muestran que tanto la glía retiniana como la de la cabeza del nervio óptico (Hernandez and Pena 1997, Johnson et al. 2000, Neufeld 1999a, Tanihara et al. 1997, Varela and Hernandez 1997, Wang et al. 2000a, Wang et al. 2002) exhibe cambios sugerentes de reactivación tales como hipertrofia y el incremento de la expresión de ciertas proteínas, entre otras la GFAP. Este comportamiento de la glía puede tener un papel dual dependiendo del proceso y de la envergadura del daño; por un lado esta activación podrá participar en procesos neuroprotectores mediante la limpieza y la reparación tisular, o contrariamente, será capaz de exacerbar los procesos de muerte celular y jugar por tanto un papel neurotóxico (Croisier and Graeber 2006, Giaume et al. 2007, Marc et al. 2008).

5.3.1 Cambios macrogliales: astrocitos y células de Müller GFAP+

5.3.1.1 Intensidad de la inmunoreactividad GFAP y morfología de los astrocitos GFAP+

La GFAP es el componente mayoritario de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos maduros. Múltiples estudios *in vivo* e *in vitro*, han

demostrado que la GFAP es esencial en la proliferación y diferenciación astrocitaria, la interacción astrocito-neurona, la protección neuronal ante procesos isquémicos (*Middeldorp and Hol 2011*) o la astrogliosis (*Perez-Alvarez et al. 2008*). Además, se sabe que de manera precoz tras una lesión retiniana, se producen cambios en la expresión de esta proteína siendo esto un signo claro de la presencia de una respuesta gliótica (*Hernandez 2000, Ramírez et al. 2001, Varela and Hernandez 1997*).

De acuerdo con esto, la reactivación de los astrocitos se caracteriza por variaciones, bien al alza o a la baja, de la GFAP, lo cual está correlacionado directamente con los cambios morfológicos que se observan en estas células durante los procesos glióticos (*David et al. 1997, Porchet et al. 2003, Ramírez et al. 2001*). De manera precoz en respuesta a la HTO, los astrocitos de la retina (*Inman and Horner 2007*) y del nervio óptico (*Hernandez and Pena 1997, Hernandez 2000, Varela and Hernandez 1997*), son capaces de presentar este tipo de cambios. Al respecto, en nuestros ratones con HTO, ambos ojos presentaban un incremento de la intensidad de la IR-GFAP en comparación con los de los animales del grupo control. Esto podría estar asociado al aumento de la intensidad de la IR-GFAP bien de los astrocitos, bien de las células de Müller o bien de ambas poblaciones en mayor o menor medida. Aunque en los ojos-HTO existía una subpoblación astrocitaria con una intensidad de la IR-GFAP más baja respecto a otros astrocitos de estos mismos ojos, sin embargo, siempre la intensidad media de la IR-GFAP de cualquiera de estas subpoblaciones, era superior a la de los ojos del grupo control, apoyando la presencia de una reactivación glial en los ojos-HTO.

A diferencia de los astrocitos, las células de Müller en condiciones normales expresan vimentina como proteína fundamental en su citoesqueleto, siendo los niveles de GFAP encontrados en estas células muy bajos en el individuo adulto. Sin embargo, de manera temprana al daño, la glía de Müller se reactiva produciéndose entonces un incremento de la GFAP (*Reichenbach and Bringmann 2010b*) que frecuentemente se asocia con la formación de cicatrices gliales (*Bringmann et al. 2006, Ramírez et al. 2010*). Estos cambios se han observado tanto en los sujetos glaucomatosos como en modelos experimentales de HTO (*Kanamori et al. 2005, Kommers et al. 1999, May 2003, Norton et al. 1992, Ramírez et al. 2010, Romano et al. 1995*), lo que concuerda con lo observado en ambos ojos (contralaterales y ojos-HTO).

de nuestro modelo de HTO, en los que hemos podido observar una intensa respuesta GFAP+ en las células de Müller. Sin embargo, otros estudios recientes en modelos de HTO no parecen encontrar cambios en la expresión de la GFAP en las células de Müller en los ojos contralaterales (*Kezic et al. 2013b*), lo que podría deberse a las diferencias entre los modelos experimentales empleados.

En nuestro modelo de HTO, asociado a los cambios descritos de la expresión de la GFAP, los astrocitos de los ojos contralaterales y de los ojos-HTO experimentaban cambios morfológicos. En los ojos contralaterales los astrocitos eran más robustos, y formaban una malla celular muy densa por toda la retina. Sin embargo, en los ojos-HTO algunos astrocitos presentaban cuerpos celulares más delgados y un menor número de prolongaciones secundarias, lo que concuerda con los hallazgos de otros modelos de HTO en rata (*Ramírez et al. 2010*). Posiblemente, estos cambios observados respecto al grupo control podrían asociarse a modificaciones funcionales claves que podrían estar mediando en la supervivencia de las CGRs (*Lorber et al. 2012*).

Sin embargo, otros estudios han postulado que la respuesta de la GFAP no tiene porqué ocurrir siempre en esta dirección. En un modelo de diabetes experimental en ratas, se observó cómo la expresión de la GFAP de la retina respondía de forma diferente en los astrocitos que en las células de Müller, produciéndose una reducción de la inmunorreactividad en los primeros, y por el contrario un aumento de ésta en la glía de Müller (*Barber et al. 2000*). Esta reacción opuesta, se ha observado también en otros modelos de HTO en ratas (*Kanamori et al. 2005, Ramírez et al. 2010*), lo que podría explicar en parte nuestras observaciones en los ojos-HTO, donde un gran número de astrocitos parecían poseer una bajada de la IR-GFAP respecto a otros astrocitos del mismo ojo y a la glía de Müller.

Curiosamente, la expresión de la GFAP en los ojos contralaterales difería de la de los ojos del grupo control, pero sin embargo no lo hacía de los ojos-HTO. Es decir, los ojos contralaterales parecían tener un comportamiento más afín a los ojos-HTO que al de los ojos del grupo control. Esto apoyaría el hecho de que aún en ausencia de afectación neuronal, como ya hemos visto previamente, se estuviera produciendo una reactivación

glial precoz. El papel de esta gliosis en los ojos contralaterales no tratados por tanto, podría estar mediando en la supervivencia neuronal ante la presencia de cambios incipientes potencialmente nocivos en estos ojos y jugar por tanto un papel neuroprotector.

5.3.1.2 Número de astrocitos GFAP+

La hipertrofia glial a menudo se sucede por una hiperplasia, es decir, por un incremento del número de células. Existen diferentes patologías que afectan a la retina y al nervio óptico en las que están descritos estos procesos de tipo proliferativo, entre ellas la retinopatía diabética (*Barber 2003*) y el aplastamiento o la axotomía del nervio óptico (*Wohl et al. 2009*).

Sin embargo, en la neuropatía óptica glaucomatosa no está claro si se produce un aumento del número de células macrogliales (astrocitos y células de Müller). Al respecto, Ramírez y cols. (*Ramírez et al. 2010*) en un modelo de HTO en rata, observaron cómo el número de astrocitos GFAP+ no sólo no se incrementaba, sino que sufría una disminución significativa. Este hecho podría deberse bien a la pérdida de los astrocitos retinianos consecuentemente a un daño severo, o bien sólo a una disminución en la expresión de la GFAP de éstos que impediría reconocerlos y por tanto cuantificarlos, hecho que se ha visto que ocurre en otros modelos de glaucoma (*Kanamori et al. 2005*) y en otras patologías como la diabetes (*Barber et al. 2000*). En nuestro modelo experimental en el ratón Swiss, entre los signos de activación macroglial que se observaban, los ojos-HTO no presentaban una variación del número de astrocitos GFAP+. Parece por tanto estar produciéndose una respuesta gliótica reactiva pero no proliferativa, similar a la ya descrita en otros modelos de HTO tanto en el ratón (*Bolz et al. 2008, Inman et al. 2011, Inman and Horner 2007*) como en la rata (*Bolz et al. 2008, Inman et al. 2011, Ramírez et al. 2010*). Este comportamiento podría explicarse si se tiene en cuenta que las respuestas glióticas no proliferativas astrocitarias aparecen secundariamente a las degeneraciones neuronales lentas, como es el caso de la patología glaucomatosa, mientras que las degeneraciones rápidas conducen a una gliosis que se acompaña por un incremento del número celular (*Bolz et al. 2008, Inman and Horner 2007, Soto et al. 2008*).

5.3.1.3 Área de retina ocupada por el inmunomarcaje GFAP+

Las células macrogliales de la retina mantienen una estrecha relación con los vasos sanguíneos y con las CGRs, y desempeñan funciones que garantizan la funcionalidad neuronal gracias al mantenimiento de la homeostasis del tejido y la liberación de factores neurotróficos y antioxidantes (Wyss-Coray and Mucke 2002). Ante situaciones patológicas, el soporte extra de una gliosis moderada y transitoria podría mediar en la supervivencia de las neuronas, sin embargo una reactivación crónica de las células gliales, podría exacerbar el daño neuronal debido entre otras causas a un fallo del reciclaje del glutamato y a la producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Dreyer et al. 1996, Kawasaki et al. 2000).

En los ojos-HTO de nuestros ratones, las células de Müller incrementaban su IR-GFAP considerablemente respecto al grupo control; sin embargo y a pesar de ello el AR-GFAP en estos ojos era significativamente menor que el de los ojos del grupo control y el de los contralaterales. Si además de esto tenemos en cuenta que tampoco existía una disminución del número de células GFAP+ en los ojos-HTO, esta reducción de la AR-GFAP podría explicarse por la presencia en estos ojos de una subpoblación de astrocitos con somas más delgadas y con un menor número de prolongaciones secundarias. Que esto fuera así, podría ser un factor de riesgo que comprometiese el soporte neuronal que ejerce la macroglía en condiciones normales y consecuentemente vulnerar la viabilidad celular (Morrison et al. 2011). Curiosamente y apoyando esta hipótesis, en los ojos-HTO, las zonas de la retina que presentaban una menor AR-GFAP tenían un mayor número de CGRs NF-200+, un signo de afectación neuronal. Este deterioro neuronal también podría estar asociado al descenso del número de prolongaciones secundarias de algunos astrocitos GFAP+ que se observaban en los ojos-HTO. En la retina humana, las prolongaciones de estas células se encuentran interconectadas a través de desmosomas (Ikui et al. 1976, Ramírez et al. 1996) y de uniones gap (Ramírez et al. 1996), formándose una amplia red celular. A través de estas interconexiones astrocitarias, presentes también en roedores y en otras especies animales (Bussow 1980, Hollander et al. 1991, Zahs and Newman 1997), circulan, entre otros, iones, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas, participando estas células por tanto de manera

activa en el soporte trófico de las neuronas y también en el metabolismo de los neurotransmisores y del CO₂. Otra posible interconexión entre la alteración neuronal que se observaba en nuestros ojos-HTO y la población microglial podría apoyarse en los hallazgos de Divas y cols. (Dibas et al. 2008). Estos autores observaron una menor expresión de acuoporinas de tipo 4 y la acumulación de ubiquitinas en los astrocitos, debido a un fallo en la transferencia de estas proteínas hacia las CGRs vecinas. La atenuación de la ubiquitinación en los axones de las CGRs, podría asociarse a una acumulación de proteínas proapoptóticas, como por ejemplo las caspasas, Bax y Bad (Dahlmann 2007) y por tanto contribuir a la degeneración neuronal en el glaucoma.

En los ojos contralaterales de nuestros ratones con HTO, además de los cambios descritos en la IR-GFAP, también fue evidente un aumento significativo de la AR-GFAP en comparación con los ojos control, lo que parecía concordar con la hipertrofia astrocitaria que se observaba en estos ojos. Partiendo del hecho de que en este modelo está documentado que en los ojos contralaterales el número de CGRs FG+ y/o Brn3a+ es normal (Salinas-Navarro et al. 2009a) y que nuestros estudios tampoco observaban CGRs NF-200+, el comportamiento gliótico de estos ojos podría estar participando de manera más activa en el mantenimiento de la homeostasis del tejido y por tanto jugar un papel neuroprotector. No obstante, este comportamiento no parece estar del todo claro; en otros estudios de HTO unilateral en rata albina, contrariamente a nuestros hallazgos, los ojos contralaterales normotensos presentaban una disminución del AR-GFAP (Ramírez et al. 2010) sin observarse en ellos una reducción del número de CGRs (Salinas-Navarro et al. 2009c, Salinas-Navarro et al. 2010). Estas diferencias respecto a nuestro modelo, podrían ser dependientes de la especie o del modelo de HTO (Morrison et al. 2011).

5.3.2 Cambios en la población celular Iba-1+

La microglía está considerada la célula inmunocompetente del SNC y es la encargada de la vigilancia de este tejido (Tezel 2013). Estas células son capaces de detectar de manera precoz cambios potencialmente dañinos y gracias a ello mediar en la restauración de la homeostasis del tejido (Hsu et al. 2003, Kreutzberg 1996, Kreutzberg 1995, Ling et al. 2001). De manera similar a lo que ocurre en el cerebro, la microglía en la retina está implicada en el

curso de diferentes patologías, entre ellas la degeneración macular asociada a la edad o la retinopatía diabética (Chen et al. 2002, Combadiere et al. 2007, Gaucher et al. 2007, Harada and Harada 2004, Langmann 2007, Schuetz and Thanos 2004).

Las células microgliales también parecen estar implicadas en procesos de muerte de las CGRs como puedan ser la axotomía (Bodeutsch and Thanos 2000, Galindo-Romero et al. 2013, Garcia-Valenzuela and Sharma 1999, Panagis et al. 2005, Sobrado-Calvo et al. 2007, Thanos et al. 1992, Zhang and Tso 2003), el glaucoma humano (Neufeld 1999a, Vrabec 1975, Yuan and Neufeld 2001) y diferentes modelos experimentales de HTO (Chauhan et al. 2002, Ebnetter et al. 2010, Inman and Horner 2007, Johnson et al. 2007, Lam et al. 2003, Naskar et al. 2002, Son et al. 2010, Wang et al. 2000a). En el curso de la patología glaucomatosa la reactivación microglial podría asociarse a la presencia de muerte y/o afectación de las CGRs y/o a señales proinflamatorias, como el iNOS o el TNF- α (Neufeld et al. 1997, Rieck 2013, Tezel et al. 2001a, Yan et al. 2000, Yuan and Neufeld 2000). Hoy por hoy no se conoce a ciencia cierta cuál podría ser el papel de la reactivación microglial en esta patología de carácter crónico, sin embargo, se ha visto que su control parece mejorar la supervivencia de las CGRs (Baptiste et al. 2005, Bosco et al. 2008, Bosco et al. 2012, Yang et al. 2013), lo que apuntaría hacia que una reactivación microglial crónica no controlada podría exacerbar la cascada de muerte celular (Hanisch 2002, Krady et al. 2005, Langmann 2007, Luo et al. 2010b, Schuetz and Thanos 2004, Wang et al. 2005a).

Esta reactivación microglial, tanto en el cerebro como en la retina, se caracteriza por exhibir una serie de cambios morfológicos, procesos proliferativos, migratorios y otras modificaciones inmunofenotípicas (Chen et al. 2002, Graeber and Streit 2010, Graeber 2010, Kreutzberg 1996, Kreutzberg 1995, Langmann 2007, Streit et al. 1988, Streit et al. 1999, Zhang et al. 2005b, Zielasek and Hartung 1996).

5.3.2.1 Cambios morfológicos y dominios espaciales de las células Iba-1+

Bajo condiciones fisiológicas, la microglía madura se encuentra en un estado quiescente o de reposo. Ésta se caracteriza por ser una célula muy ramificada, gracias a lo cual es capaz de relacionarse con el entorno de forma activa (Nimmerjahn et al. 2005) y participar en la defensa, en la regulación de la actividad neuronal y en el mantenimiento

de la homeostasis extracelular (*Hanisch and Kettenmann 2007, Kettenmann et al. 2011, Kreutzberg 1995, Streit 2002*). En condiciones hostiles la microglía se reactiva, produciéndose en ella cambios morfológicos, entre los que clásicamente destacan la hipertrofia celular y la retracción de sus prolongaciones, antes de producirse una retracción total de éstas últimas que dará a la microglía un aspecto ameboideo similar al de los macrófagos (*Beynon and Walker 2012, Stence et al. 2001*). Al respecto, tanto los ojos-HTO como los contralaterales de nuestro modelo se caracterizaban por poseer unas células Iba-1+ que mostraban una retracción generalizada de sus prolongaciones, en concordancia con la reducción del área de retina que ocupaba cada célula Iba-1+ en la CPE y en la CPI.

En el curso de los procesos neuroinflamatorios (*Walker et al. 2014*), incluso en los que tienen lugar en la retina (*Lewis et al. 2005*), aparece una microglía de aspecto ameboideo en la región del daño, probablemente como resultado de transformaciones morfológicas severas de la microglía ramificada residente (*Bosco et al. 2012, Chiu et al. 2010, Ebert et al. 2009, Garcia-Valenzuela et al. 2005, Joly et al. 2009, Karlstetter et al. 2010, Lewis et al. 2005, Santos et al. 2010, Sasahara et al. 2008*). Acorde a esto, en los ojos-HTO de nuestro modelo se observaban unas células Iba-1+ de apariencia ameboidea compartiendo escenario con las células Iba-1+ de aspecto ramificado. Los ojos contralaterales, donde no existía una afectación de las CGRs (*Salinas-Navarro et al. 2009a*), presentaban también de forma excepcional alguna de estas células Iba-1+ de apariencia ameboidea. El hecho de encontrar estas células en los ojos contralaterales, asumiendo que éstas son fruto de una transformación severa de las células Iba-1+ ramificadas residentes, apuntaría a que en estos ojos podrían estar teniendo lugar ciertos cambios que serían responsables de una reactivación microglial en ausencia de una afectación neuronal detectable.

Además de estos signos morfológicos clásicos sugerentes de reactivación microglial, otros estudios han descrito un estadio intermedio entre la microglía quiescente y la activada (*Streit et al. 1999*). En éste, la microglía característicamente aumenta el número de prolongaciones secundarias, pero no de las primarias (*Beynon and Walker 2012, Hinwood et al. 2013, Walker et al. 2013*), sin modificar el área que ocupa la célula (*Beynon and Walker 2012, Hinwood et al. 2013*). Esta microglía hiperramificada como se la conoce, se ha observado en

presencia de diferentes señales de estrés no patológicas en el tejido nervioso (*Fontainhas et al. 2011, Hinwood et al. 2013, Sugama et al. 2007, Tremblay et al. 2010, Tynan et al. 2010*), pero también en el curso de procesos degenerativos cerebrales asociados a un daño axonal (*Hurley and Coleman 2003, Morrison and Filosa 2013, Wilson and Molliver 1994*). Esta microglía hiperramificada parece tener la habilidad de reorientar sus prolongaciones, y gracias a ello, realizar más contactos con las terminaciones sinápticas (*Fontainhas et al. 2011, Hinwood et al. 2013, Tremblay et al. 2010*). Acorde a esto, al menos parcialmente, las células Iba-1+ de la CPI y de la CPE de ambos ojos de nuestros ratones con HTO, aumentaban la complejidad de sus prolongaciones, lo cual parece estar en claro acuerdo con la afectación neuronal de toda la retina que se observaba en los ojos-HTO de nuestro modelo (*Cuenca et al. 2010*). Dado que la microglía está encargada de la vigilancia del medio extracelular, que éstas incrementen la complejidad de su arborización ante determinadas señales, podría tener como finalidad aumentar el área de supervisión y/o de relación con las neuronas, lo cual podría jugar un papel clave en la supervivencia neuronal. Este hecho en la CPI y en la CPE de los ojos-HTO podría estar participando en una reorganización del circuito neuronal (*Neumann et al. 2009, Perry and O'Connor 2010*) mediante la desconexión y eliminación de los contactos sinápticos alterados (*Cao et al. 2012, Perry and O'Connor 2010*), en un proceso conocido como *stripping sináptico* (*Blinzinger and Kreutzberg 1968, Cho et al. 2006*), que trataría de evitar la propagación del daño a otras zonas del tejido. Por el contrario, en los ojos contralaterales de nuestros ratones con HTO, la ausencia de afectación neuronal, apuntaría nuevamente a que este incremento en la complejidad de las prolongaciones microgliales podría deberse a la existencia de señales de estrés potencialmente dañinas. En este momento, la microglía podría estar mediando en la homeostasis del tejido, garantizando la supervivencia neuronal y por tanto estar jugando un papel neuroprotector en estos ojos.

Una característica de los procesos neurodegenerativos, entre ellos el glaucoma, es que el daño en las neuronas se produce de manera compartimentalizada (*Libby et al. 2005b*). Teniendo esto en cuenta, la estrecha relación espacial que tiene la microglía con el soma, las dendritas y los axones de las CGRs (*Bosco et al. 2011*), podría constituir un mecanismo muy eficiente en la detección de cambios a cualquier nivel neuronal. En los ojos-HTO de nuestro modelo, se observaba novedosamente unas células Iba-1+ de morfología alargada en la

CFN-CCG. Este tipo morfológico de células, a las que se las ha denominado “*microglía en bastón*”, ha sido descrito en procesos isquémicos cerebrales (Masuda et al. 2011), tras una lesión del nervio hipogloso (Svensson and Aldskogius 1993) y durante la inflamación en la corteza cerebral (Trapp et al. 2007), todos ellos, al igual que el glaucoma, procesos neurodegenerativos que cursan con daño axonal. Las células Iba-1+ en bastón de los ojos-HTO, se disponían paralelas al curso de los axones NF-200+ de las CGRs, aunque también podían relacionarse con los somas y dendritas NF-200+, es decir, con las neuronas dañadas. La presencia de esta microglía podría jugar bien un papel protector para los axones que aún no estuvieran lesionados (Ziebell et al. 2012) o bien, al igual que la microglía hiperramificada, estar tratando de reorganizar un circuito neuronal alterado debido a la neurodegeneración glaucomatosa (Neumann et al. 2009, Perry and O'Connor 2010). Curiosamente, la CFN-CCG es el único estrato de toda la retina donde las células Iba-1+ no experimentaban un aumento de la complejidad de sus prolongaciones. Sin embargo, las células Iba-1+ en bastón podrían estar degradando la MEC en torno a la CGRs NF-200+, favoreciendo la retracción de los axones distróficos y la desaparición de las sinapsis alteradas mediante el stripping sináptico, evitando así la propagación del daño a otras zonas intactas del tejido (Cao et al. 2012, Perry and O'Connor 2010). Aunque en la retina patológica está documentada la presencia de células microgliales con esta morfología en bastón (Sobrado-Calvo et al. 2007), sin embargo, no está descrito una funcionalidad específica de estas células. Esto podría deberse a que en la literatura se asume que la microglía es una célula de gran plasticidad y que el espacio donde se localiza es lo que determina su morfología final. Por tanto, dado que estas células se observaban en la CNF-CCG, donde discurren paralelamente los axones de las CGRs, podría parecer normal que la microglía adquiriese una morfología alargada para disponerse entre ellos. Sin embargo, ni en los ojos de los ratones del grupo control ni en los ojos contralaterales, donde no existen neuronas ni axones degenerados, se observaron células Iba-1+ en bastón. Así pues, su presencia específica en las retinas con daño neuronal, ojos-HTO, podría apoyar que estas células estuviesen realizando las mismas funciones que parecen desarrollar en los procesos neurodegenerativos en el cerebro.

5.3.2.2 Redistribución de las células Iba-1+

Estudios en diferentes especies animales, entre ellas los peces (Cuadros et al. 2006, Dowding et al. 1991, Salvador-Silva et al. 2000, Velasco et al. 1999), anfibios (Goodbrand and Gaze 1991), aves (Cuadros et al. 2006, Navascues et al. 1994, Won et al. 2000) y en mamíferos como el conejo (Ashwell 1989, Humphrey and Moore 1996, Schnitzer 1989), el ratón (Bosco et al. 2011, Santos et al. 2008, Santos et al. 2010, Zhang et al. 2005a), la rata (Ashwell et al. 1989, Harada et al. 2002, Zhang et al. 2005b), monos (Boycott and Hopkins 1981, Vrabec 1970) y humanos (Diaz-Araya et al. 1995, Gupta et al. 2003, Penfold et al. 1991, Provis et al. 1995, Yang et al. 2000), han evidenciado que no existe un patrón general de distribución microglial en la retina adulta. Sin embargo, la microglía suele encontrarse habitualmente en condiciones normales en la retina más interna, con presencia en todas las capas de fibras (CFN, CPI y CPE) y en la CCG, estando por norma ausentes en la retina más externa (Lee et al. 2008, Santos et al. 2008, Santos et al. 2010). En la CNI del ratón la presencia de estas células suele ser escasa (Bosco et al. 2011) y en otras especies, como en la codorniz, aparece tan sólo en la etapa embrionaria (Marin-Teva et al. 1998, Marin-Teva et al. 1999a, Marin-Teva et al. 1999b, Marin-Teva et al. 1999c, Navascues et al. 1994, Navascues et al. 1995). En los ratones albinos Swiss del grupo control, la disposición de la microglía Iba-1+ en la retina era similar a lo observado en otras especies y característicamente las células de un estrato retiniano no solían invadir las capas anexas. Diferiendo de otras especies, los ratones Swiss del grupo control presentaban algunas células Iba-1+ localizadas entre la CFR y el EPR (CFR-EPR).

La membrana apical del EPR está separada de los segmentos externos de los fotorreceptores por el ES, el cual goza de un inmunoprivilegio en condiciones normales gracias a una colección de citoquinas secretadas por el propio EPR (Holtkamp et al. 2001, Streilein et al. 2002, Sugita 2009) y a la ausencia de células inmunes (Xu et al. 2009) y de microglía. No obstante, durante el desarrollo embrionario de algunos mamíferos y marsupiales, aparecen macrófagos en esta región (Kezic and McMenamin 2008, McMenamin and Loeffler 1990, McMenamin 1999a), que debido a la muerte masiva de fotorreceptores que se produce en este momento, podrían estar suplementando las funciones fagocíticas del EPR. Aunque en los mamíferos adultos la presencia de estas células está relacionada generalmente con la presencia de patologías retinianas (Combadiere et al. 2007, Joly et al. 2009, Kezic et al. 2013a, Kezic et

al. 2013b, Ng and Streilein 2001, Santos et al. 2010), sin embargo en algunos mamíferos (*Herman and Steinberg 1982*), al igual que en no mamíferos, entre ellos los teleósteos (*Allen and Hallows 1997, Braekevelt 1985, Lillo et al. 2001*) y los anfibios (*Eckmiller and Steinberg 1981*), es posible encontrar macrófagos en esta región. En los murinos también es poco frecuente observar células en la CFR-EPR, aunque este hecho parece ser dependiente de la pigmentación del animal. Al respecto, Ng y cols. (*Ng and Streilein 2001*) detectaron células en el ES de ratones albinos pero no en las cepas pigmentadas.

Desde el momento en el que los ratones albinos abren los ojos, comienzan a observarse macrófagos en la región de la CFR-EPR. Éstos aumentan de número hasta los seis meses de vida y posteriormente disminuyen con la edad (*Sanyal et al. 1984*). Al respecto, los murinos albinos parecen ser más vulnerables que los animales pigmentados al daño neuronal producido por la luz (*Combadiere et al. 2007, Garcia-Ayuso et al. 2008, Noell et al. 1966, Sanyal et al. 1984, Wasowicz et al. 2002*). Sanyal y cols. (*Combadiere et al. 2007, Garcia-Ayuso et al. 2008, Noell et al. 1966, Sanyal et al. 1984, Wasowicz et al. 2002*) observaron que existían un mayor número de macrófagos en la CFR-EPR en los ratones albinos que estaban expuestos a la luz en comparación con los mismos animales mantenidos en condiciones de oscuridad. Por otro lado, los estudios de Ng y Streilein (*Ng and Streilein 2001*) mostraban una estrecha correlación directa entre el nivel de iluminación y el número de células macrofágicas que se observaban en la región CFR-EPR. Sumado a esta mayor sensibilidad al daño por fototoxicidad de los ratones albinos, se ha observado que la respuesta electrofisiológica derivada de su EPR (onda c), parece ser diferente a la obtenida en ratones pigmentados, por lo que el EPR en ambos animales podría responder de forma desigual a cambios iónicos en el ES (*Wu et al. 2004*). Debido a que el EPR participa en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores y bloquea la entrada en la retina de componentes inmunes (*Bok 1993, Marmorstein 2001*), por un lado la mayor vulnerabilidad de los animales albinos a la fototoxicidad y por otro la electrofisiología peculiar del EPR asociada a la cepa albina podría explicar la presencia de células Iba-1+/MHC-II+/CD68+ en la CFR-EPR, incluso en condiciones normales, que podrían suplementar las funciones fagocíticas del EPR en nuestros ratones albinos Swiss (*Irschick et al. 2004, Sanyal et al. 1984*).

Además de esta organización por estratos, las células microgliales Iba-1+ de las capas de fibras en nuestros ratones se distribuían por toda la superficie de la retina conformando un mosaico celular (*Bosco et al. 2011, Hume et al. 1983*). A pesar de que las células estaban dispuestas muy próximas unas a otras dentro de este entramado, sin embargo, no realizaban contactos entre ellas, lo que concordaba con lo descrito en otros estudios (*Fontainhas et al. 2011, Humphrey and Moore 1995, Kreutzberg 1995, Lee et al. 2008, Navascues et al. 1994*). La microglía quiescente, lejos de ser una célula estática, experimenta de manera muy dinámica cambios en sus prolongaciones, lo que podría permitir el intercambio de información entre las microglías vecinas (*Lee et al. 2008*). Si esto fuese así, este entramado celular constituiría un medio de comunicación entre las células de todo el parénquima, que junto con la profusa ramificación de éstas, podría ser un mecanismo muy eficiente para la detección rápida de cualquier cambio que comprometiese la supervivencia neuronal.

En los diferentes ojos de estudio de nuestro trabajo, el mosaico celular de la CPI y de la CPE era aparentemente más regular que el que se observaba en la CFN-CCG. Una posible explicación a esta diferencia podría deberse a que en la CFN-CCG, la homeostasis del tejido está triplemente regulada por las células microgliales, los astrocitos y las células de Müller. Sin embargo, en la CPI y la CPE, donde desaparece la influencia de los astrocitos, que el entramado microglial sea más denso quizás podría garantizar un correcto mantenimiento del medio extracelular. Además, la densidad celular en la CPE era superior a la de la CPI, a pesar de que el tamaño de las células Iba-1+ en ambas era similar. Este hecho podría deberse a que la CPE, próxima a la región de la CFR-EPR, quizás necesitase una supervisión más estricta si consideramos que el EPR de estos ratones podrían presentar cambios funcionales que le hicieran más permisivo a la entrada de células desde la coroides. Por ello, un mayor número de células en la CPE supervisaría más exhaustivamente el parénquima, pudiendo así detectar cambios sutiles en el tejido.

En el curso de diferentes patologías retinianas, la activación microglial está asociada a procesos migratorios. De esta forma la microglía podrá interaccionar y/o eliminar las neuronas muertas o dañadas del tejido (*Joly et al. 2009, Karlstetter et al. 2010, Langmann 2007, Lewis et al. 2005, Santos et al. 2010*). En la retina de los ojos-HTO y de los contralaterales en nuestro

modelo, las células Iba-1+ que en condiciones normales no invadían otros estratos anexos (Karlstetter et al. 2010), reposicionaban ahora sus somas y sus prolongaciones. Estas células se desplazaban o invadían las capas retinianas próximas, en las que probablemente estarían produciéndose alteraciones neuronales. Esto parece estar en acuerdo con la redistribución microglial que se observa en otros procesos patológicos retinianos (Chen et al. 2002, Garcia-Valenzuela et al. 2005, Gupta et al. 2003, Harada et al. 2002, Hughes et al. 2003, Humphrey and Moore 1996, Lee et al. 2008, Lewis et al. 2005, Marella and Chabry 2004, Ng and Streilein 2001, Rao et al. 2003, Roque et al. 1996, Zeng et al. 2005, Zhang et al. 2005a, Zhang et al. 2005b), entre ellos también en el glaucoma (Bosco et al. 2012, Naskar et al. 2002, Wang et al. 2000a). A pesar de que el daño glaucomatoso clásicamente se ha asociado a la degeneración de las CGRs, nuestro modelo sin embargo se caracterizaba por una afectación tanto de la retina interna como de la externa (Cuenca et al. 2010, Salinas-Navarro et al. 2009a), similar a lo observado en otros modelos de glaucoma (Fortune et al. 2004, Grozdanic et al. 2003a, Grozdanic et al. 2004, Holcombe et al. 2008, Pinilla et al. 2008) e incluso en la patología glaucomatosa humana (Nork et al. 2000). Este hecho parece ser consistente con la reorganización microglial de todos los estratos retinianos en nuestros animales con HTO. Los hallazgos migratorios que se observaban en los ojos contralaterales, incluso en ausencia de afectación neuronal (Salinas-Navarro et al. 2009a), apoyarían de nuevo un proceso gliótico de la población microglial. Dada la capacidad de vigilancia de la microglía, ésta parece estar detectando alteraciones que podrían poner en riesgo la integridad neuronal. Por tanto, la activación de estas células en estos ojos podría participar en la restauración del medio y estar ejerciendo así un papel neuroprotector.

Se sabe que cuando el EPR comienza a ser disfuncionante, como ocurre en la senectud o en el curso de diferentes patologías retinianas, la microglía residente puede migrar desde la retina más interna, adquirir características morfológicas y fenotípicas de los macrófagos y apoyar las funciones fagocíticas del EPR (Joly et al. 2009, Karlstetter et al. 2010, Thanos et al. 1996, Thanos 1992, Thanos and Richter 1993, Xu et al. 2007a, Xu et al. 2008). Inicialmente, la presencia de estas células Iba-1+ podrían favorecer la homeostasis del medio, sin embargo su presencia y activación crónica, como se ha visto en diferentes distrofias retinianas, en modelos de fototoxicidad o en patologías asociadas a la edad tanto en modelos animales como en el humano (Chinnery et al. 2012, Combadiere et al. 2007, Gupta et al.

2003, Joly et al. 2009, Ng and Streilein 2001, Santos et al. 2010, Thanos 1992, Thanos and Richter 1993, Zeng et al. 2005), perpetuaría un ambiente proinflamatorio que podría alterar morfológica y funcionalmente el EPR (Ma et al. 2009, Xu et al. 2009). Al respecto, se ha observado una reducción de la expresión de ciertas proteínas implicadas en el mantenimiento de las uniones estrechas entre las células del EPR, como la ZO-1 y la claudina-1. Esto podría ser consecuente con una alteración de la barrera hematorretiniana externa, favoreciéndose la comunicación entre la retina y la coroides. Junto a esto, la activación crónica de las células del ES lleva asociado un incremento de sustancias proinflamatorias y quimioquinas, que podría favorecer la entrada de células desde el torrente sanguíneo hacia el parénquima retiniano (Combadiere et al. 2007).

En los ratones del grupo control, las células Iba-1+ de somas ovoideos de la región de la CFR-EPR, se disponían por lo general alejadas del EPR y disponían sus prolongaciones perpendiculares a la superficie retiniana. Sin embargo, en ambos ojos de nuestros ratones con HTO, estas células parecían haber migrado desde su localización original hacia las proximidades del EPR, lo que coincide con las observaciones de Chinnery y cols. (Chinnery et al. 2012), y disponían sus prolongaciones paralelas a la superficie de la retina en una misma dirección, algo que era más evidente en los ojos-HTO. Este hecho se ha observado en otros procesos patológicos focales de la retina y parece, aunque no está del todo claro, estar asociado a un comportamiento migratorio de estas células hacia la región del daño (Eter et al. 2008, Lee et al. 2008). Teniendo en cuenta que la región en torno al EPR parece ser un área conflictiva en nuestros ratones, la presencia de estas células Iba-1+ en sus proximidades, podría estar intentando controlar una posible entrada de células desde el torrente sanguíneo hacia la retina, asociado a una barrera hematorretiniana externa posiblemente alterada. A pesar de este intento, en los ojos-HTO se observaban algunas células Iba-1+/MHC-II+/CD68+ de aspecto redondeado, similar al de los macrófagos, y otras con apariencia dendritiforme Iba-1+/MHC-II+, similares a las descritas en la CPI o bien a otras presentes en la coroides y el cuerpo ciliar. De todo ello se deriva que la presencia de estos tipos de células Iba-1+ en la región del ES en los ojos-HTO de nuestro modelo podría ser, en mayor o menor medida, el resultado bien de la migración de células Iba-1+ residentes desde las capas más internas de la retina (Ma et al. 2009, Ng and Streilein 2001, Santos et al. 2010),

bien de la entrada de células Iba-1+ desde la coroides y/o el cuerpo ciliar (*Hisatomi et al. 2003, Kaneko et al. 2008*) o bien una combinación de ambos mecanismos.

El estrés crónico asociado a la patología glaucomatosa parece correlacionarse con un fallo de las barreras hematorretinianas perivasculares (*Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009*). En esta patología, el incremento de la MMP-9 podría participar en la rotura de estas barrera y ser un factor determinante en la entrada de células del torrente sanguíneo hacia el parénquima retiniano (*Golubnitschaja-Labudova et al. 2000*). Al respecto, en la CFN-CCG de los ojos-HTO aparecían frecuentemente unas células Iba-1+/MHC-II+/CD68+ de aspecto redondeado en relación con los vasos sanguíneos. Estas células podrían ser monocitos/macrófagos que habrían entrado en la retina desde el torrente sanguíneo como consecuencia de un fallo de la barrera hematorretiniana, hecho que se ha observado en diversos modelos de patologías retinianas (*Joly et al. 2009, Kaneko et al. 2008, Langmann 2007*), incluido el glaucoma (*García-Valenzuela et al. 2005, Howell et al. 2012, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009, Zhang and Tso 2003*). Se postula que esta invasión podría ser determinante en las primeras fases la patología; esto podría perpetuar un ambiente proinflamatorio y ser un posible factor desencadenante del proceso neurodegenerativo en el glaucoma (*Howell et al. 2011, Howell et al. 2012*). Al respecto, Howell y cols. (*Howell et al. 2012*) observaron en la retina de ratones DBA/2J la presencia de células redondeadas Iba-1+/CD68+, antes incluso de existir un daño de las CGRs, y documentaron cómo una reducción de este tipo de células mejoraba notablemente la supervivencia neuronal en el curso de la patología.

5.3.2.3 Aumento del número de células Iba-1+

Los procesos patológicos pueden llevar asociados dos formas diferentes de gliosis, una proliferativa y otra no proliferativa. En el glaucoma no existe un acuerdo sobre cuál de las dos formas predomina, observándose en algunos modelos un aumento del número de astrocitos (*Johnson et al. 2000, Minckler and Spaeth 1981*), mientras que en otros sólo parece existir una proliferación de la microglía y no del resto de estirpes gliales (*Bosco et al. 2008*,

Bosco et al. 2012, Chauhan et al. 2002, Garcia-Valenzuela et al. 2005, Inman et al. 2011, Inman and Horner 2007, Johnson et al. 2007, Lam et al. 2003, Naskar et al. 2002, Wang et al. 2000a, Yuan and Neufeld 2001).

Tanto los ojos-HTO como los contralaterales de nuestro modelo, presentaban un aumento generalizado del número de células Iba-1+ de la retina. Estos hallazgos del ojo contralateral, parecen diferir de otros estudios recientes en modelos de HTO (*Liu et al. 2012*), lo cual podría asociarse a la diferencia de los modelos de glaucoma empleados.

Este aumento del número de células podría deberse bien a una mitosis de la microglía residente (*Kaneko et al. 2008, Wohl et al. 2010*) o bien a la entrada de células en la retina desde el cuerpo ciliar, la coroides o el torrente sanguíneo (*Caicedo et al. 2005, Combadieri et al. 2007, Davalos et al. 2005, Joly et al. 2009, Kaneko et al. 2008, Kezic and McMenamin 2008, Lewis et al. 2005, Muther et al. 2010, Prinz and Mildner 2011, Prinz et al. 2011, Tambuyzer et al. 2009, Wohl et al. 2010, Xu et al. 2007a*) que podrían diferenciarse en células microgliales Iba-1+ ramificadas.

Los estudios en quimeras de Kaneko y cols. (*Kaneko et al. 2008*) detectaron en la retina unas células Iba-1+ procedentes de la médula ósea similares morfológicamente a las microglías residentes de la retina. En condiciones fisiológicas, estas células eran escasas y se localizaban en torno al disco óptico y próximas al cuerpo ciliar. Estos resultados concordaban con la pequeña subpoblación de células Iba-1+/MHC-II+ de aspecto dendritiforme que se observaban en los ratones Swiss control en la CPI. Aunque la apariencia morfológica de nuestras células difería de las observaciones por Kaneko y cols., sin embargo, por un lado su similitud morfológica con otras células presentes en el cuerpo ciliar y en la coroides, parecía conferirles un origen medular (*McMenamin et al. 1992, McMenamin et al. 1994, McMenamin 1999b*), y por otro su alta expresión de moléculas del MHC-II, podría apoyar que se tratase de las mismas células descritas por estos autores.

Asociado al daño retiniano en los mismos estudios de Kaneko y cols. (*Kaneko et al. 2008*), se observaba una migración de células Iba-1+ tanto desde el cuerpo ciliar como desde el torrente sanguíneo. Estas zonas parecen ser reservorios estratégicos desde donde las células podrían migrar rápidamente a la retina en las primeras etapas de los procesos patológicos. Respecto a una posible migración desde el cuerpo ciliar, dado que las células Iba-1+ de aspecto dendritiforme en nuestros ratones, localizadas en la retina de forma

coincidente con los estudio de Kanejo y cols., tenían una morfología diferente al resto de células Iba-1+ ramificadas, si tras el incremento de la PIO existiera una migración masiva de estas células a la retina, éstas podrían observarse distribuidas por todo el parénquima, hecho que no era característico en nuestros ratones con HTO. A pesar de que en condiciones normales una pequeña proporción de estas células procedentes de regiones no neurales alcanza la retina (*Chen et al. 2002, Kezic and McMenamin 2008, Xu et al. 2007a*), como parecen apoyar nuestros resultados, en las retinas de nuestros ratones con HTO, una migración de éstas no parece ser clave en el aumento de células Iba-1+, lo que es coincidente con lo observado en otros modelos de muerte de CGRs (*Wohl et al. 2009*).

En cuanto a una migración celular desde el torrente sanguíneo, Kaneko y cols. (*Kaneko et al. 2008*) observaba unas células de aspecto redondeado próximas a los vasos de la retina de la CFN-CCG y en la región del ES. Esto parece corresponderse con nuestras observaciones en los ojos-HTO, donde aparecían en la CFN-CCG y en la CFR-EPR unas células Iba-1+/MHC-II+/CD68+ con una morfología similar a las descritas por estos autores. Ya que en condiciones normales es raro observar estas células en la retina (*Albini et al. 2005*), su presencia podría ser el resultado de un fallo de la barrera hematorretiniana que daría acceso a células desde el torrente sanguíneo. En base a todo lo anterior, parecería lógico pensar que esta migración de células Iba-1+ hacia la retina, previa diferenciación en microglía ramificada, en mayor o menor medida, podría contribuir al aumento del número celular observado en nuestro modelo tras el incremento de la PIO. En el resto de capas retinianas con presencia de células Iba-1+ (CPI, CNI y CPE), dada la ausencia de células de aspecto redondeado que pudiera diferenciarse en microglía ramificada, el aumento del número de células Iba-1+ observado en ellas podría ser el resultado de la migración celular desde las capas anexas o bien de la proliferación de la microglía residente en estas capas. Esto parece estar en acuerdo con los ojos contralaterales, donde no se observaba este tipo de células de apariencia redondeada.

La proliferación microglial puede estar influenciada por numerosos mitógenos, entre ellos el M-CSF o el GM-CSF (*Giulian and Ingeman 1988*), los cuales pueden ser secretados por los astrocitos reactivos (*Aloisi 2005*). Por tanto, puesto que en nuestro modelo de HTO,

como ya hemos visto, existe una activación marcada de la población astrogliar, esto podría ser el origen, al menos en parte, del aumento celular microglial en el curso del glaucoma.

Que en los ojos contralaterales, la microglía Iba-1+ aumente de número, sin una aparente afectación neuronal, estaría apoyando la idea de que se puedan estar sucediéndose una serie de cambios potencialmente dañinos para el tejido nervioso en estos ojos. Dado el carácter vigilante de la microglía, el aumento de su número garantizaría una supervisión más exhaustiva del medio, tratando de restaurar la homeostasis del tejido y por tanto prevenir la afectación neuronal, ejerciendo así un posible papel neuroprotector.

5.4 La inflamación y las células gliales en el glaucoma

A pesar de que la retina goza de un privilegio inmune, sin embargo no es raro observar procesos inflamatorios asociados al curso de diferentes patologías retinianas (Buschini et al. 2011, Ehlers and Fekrat 2011, Jousseaume et al. 2004, Yoshida et al. 2013), entre ellas el glaucoma (Fan et al. 2010, Joachim et al. 2013, Krizaj et al. 2014, Pinazo-Duran et al. 2013, Rieck 2013, Tezel 2011, Tezel 2013).

En la retina y el nervio óptico la glía constituye la población de células inmunes residentes, lo que las relaciona con las respuestas inflamatorias asociadas a la patología glaucomatosa (Krizaj et al. 2014, Rieck 2013, Tezel 2013). Una de las razones por las que la retina goza de un privilegio inmune, reside en la aparente ausencia de mecanismos que medien en la respuesta inmune innata, como la presencia de CPAs. Los macrófagos y las células dendríticas, son las denominadas CPAs profesionales, y son responsables de la activación de las células T a través de la presentación de los antígenos mediante las moléculas del MHC-II. En condiciones normales, la **expresión del MHC-II** en las células gliales de la retina y del nervio óptico es mínima o inexistente, y cuando aparece, está restringida habitualmente a unas cuantas microglías (Ebner et al. 2010, Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Tezel et al. 2007, Yang et al. 2001c). Todo esto concuerda con la baja expresión de estas moléculas en la microglía y en algunos astrocitos de la retina de nuestros ratones del grupo control. Así pues, a pesar de considerarse a estas células como la población inmune del SNC, su capacidad para actuar como CPAs no parece ser una característica muy marcada en

condiciones fisiológicas, no obstante parecen estar predispuestas a participar en los procesos inflamatorios. Gracias a esta baja expresión de las moléculas del MHC-II, al igual que ocurre en el cerebro, las respuestas inmunes de tipo adquirido en la retina estarían controladas, asegurando de este modo la supervivencia neuronal.

A pesar de lo anterior, en la retina de nuestros ratones control se observaba una pequeña población de **células Iba-1+ de aspecto dendritiforme**, en una zona próxima al cuerpo ciliar y otra en torno a la cabeza del nervio óptico, con una inmunorreacción MHC-II+ muy marcada. Estas células eran diferentes al resto de células Iba-1+ de la retina en cuanto a su expresión de MHC-II y a su morfología, sin embargo eran morfológicamente semejantes a las células dendríticas localizadas en la coroides y el cuerpo ciliar (Kezic and McMenamin 2008, McMenamin et al. 1992, McMenamin et al. 1994, McMenamin 1999b).

Que unas células localizadas en el tejido neural compartiesen características con otras localizadas en el tracto uveal, podría por un lado hablar en favor de un origen común y por otro de una funcionalidad también compartida. Al respecto, existe cierta controversia sobre la existencia de células dendríticas en la retina en condiciones normales, aunque parecen existir evidencias que apuestan por ello (Kaneko et al. 2008, Xu et al. 2007b). En base a estos trabajos, y a expensas de que en nuestro estudio no se emplearon marcadores específicos de células dendríticas, las similitudes morfológicas y de expresión del MHC-II de las células de aspecto dendritiforme Iba-1+ de nuestras retinas, con las células dendríticas identificadas en los estudios previos, parecería apoyar el hecho de que ambas poblaciones pudieran ser la misma. Dada esta expresión constitutiva de las moléculas del MHC-II en las células de aspecto dendritiforme Iba-1+ de nuestras retinas, éstas podrían mediar de manera rápida en las primeras etapas de las patologías retinianas (Kaneko et al. 2008). De hecho, gracias a su proximidad con los vasos sanguíneos (Lehmann et al. 2010, Xu et al. 2007b), tras reconocer los antígenos, podrían abandonar la retina, llegar a los nódulos linfáticos y promover una respuesta inmune mediada por células T.

Estas células dendritiformes Iba-1+ parecen estar asociadas a una función de vigilancia de ciertas regiones donde preferentemente comienzan algunos procesos inflamatorios retinianos, como ocurre en los modelos de uveítis autoinmunes (Xu et al.

2007b). Estas regiones parecen ser puntos débiles de la barrera hematorretiniana; por un lado el EPR, que forma la barrera hematorretiniana externa, se sabe que no llega a cubrir la extensión completa de la retina, dejando una pequeña zona neural en torno al nervio óptico en contacto directo con la coroides. Y por otro lado, la retina sensorial se continúa directamente con las células epiteliales del cuerpo ciliar. Ambas condiciones dejan desprovista a la retina neural de una barrera física con las estructuras vasculares anexas (Xu et al. 2007b). Esta localización concordaba a la perfección con los resultados derivados de nuestros ratones. Además, Lehmann y cols. (Lehmann et al. 2010) mediante un modelo de ratón transgénico (CD11c-DTR), donde las células dendríticas CD11c+ expresaban la proteína fluorescente verde GFP, observaron también estas células en contacto con los grandes vasos sanguíneos de la CFN-CCG. Nuestros resultados mostraban la presencia de unas células Iba-1+/MHC-II+ localizadas en torno a los vasos de la retina, similar a lo observado por otros autores (Aloisi et al. 2000b). Éstas tenían un aspecto morfológico tosco, que difería de nuevo de las células Iba-1+ ramificadas. Teniendo en cuenta los resultados de Lehmann y cols., estas células podrían ser parte de la población de células dendríticas de la retina.

Por todo lo descrito anteriormente, que en relación con el tejido neural exista esta población celular Iba-1+/MHC-II+ con características similares a las células dendríticas, podría ser clave en el reconocimiento rápido de señales potencialmente dañinas para el tejido y por tanto para el comienzo de una respuesta de tipo inmune en el curso de diversas patologías, entre ellas el glaucoma.

La presencia de señales de estrés asociadas a la neurodegeneración glaucomatosa, son responsables de una reactivación de las células gliales. Asociado a esta reactivación, la producción de citoquinas (Tezel et al. 2001a, Tezel and Wax 2000a, Yan et al. 2000), sustancias inmunorreguladoras (Luo et al. 2010a), componentes del complemento (Kuehn et al. 2006, Tezel et al. 2010) y el incremento de la expresión de receptores de tipo Toll en las células gliales (Luo et al. 2010a), conforma el escenario perfecto para que éstas participen activamente en una respuesta inmune en el glaucoma. Aunque inicialmente esto podría tratar de restaurar la homeostasis tisular, sin embargo, una respuesta descontrolada desencadenará una

reacción de carácter autoinmune (Tezel and Wax 2007, Tezel 2011, Wax and Tezel 2009) o una respuesta de tipo adaptativo (Tezel et al. 2007) que podría exacerbar el daño neuronal. Se ha descrito cómo la reactivación glial en el glaucoma es un indicador claro de la existencia de un proceso neuroinflamatorio (Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009) y que esta reactivación se acompaña por un aumento de la expresión de las moléculas del MHC-II en estas células (Ebnetter et al. 2010, Fan et al. 2010, Neufeld 1999a, Tezel et al. 2003, Tezel et al. 2007, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009, Yang et al. 2001c) y por tanto de un incremento de su capacidad presentadora del antígeno (Steele et al. 2006, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009).

Basándonos en lo expuesto hasta ahora, el aumento de la expresión del MHC-II en la glía de los ojos contralaterales de nuestro modelo de HTO, evidenciaría la presencia de un proceso neuroinflamatorio (Walker et al. 2014), aún en ausencia aparente de degeneración neuronal. Esto podría responder a una reacción conocida como *parainflamación*, que es una situación intermedia entre un estado basal y la inflamación clásica, a través de la cual las células inmunes desencadenan una inflamación leve con el fin de restaurar la homeostasis del tejido (Medzhitov 2008). La reactivación de la microglía parece mediar en la puesta en marcha de una reacción parainflamatoria (Buschini et al. 2011). De la misma forma, Howell y cols. (Howell et al. 2012) observaron cómo en los ratones DBA/2J, una reactivación de las células gliales incipiente al daño glaucomatoso, parecía mediar en la supervivencia de las CGRs. Sin embargo, esta respuesta puede llegar a cronificarse ante la presencia continua de estímulos nocivos, y tener un resultado adverso en el curso de las patologías (Buschini et al. 2011), como podría estar ocurriendo en los ojos-HTO de nuestros ratones. En éstos ojos, se observaba un incremento de las moléculas del MHC-II que, a diferencia de los ojos contralaterales, se acompañaba por un proceso neurodegenerativo.

En base a lo anterior, las células T podrían participar por tanto en la neurodegeneración glaucomatosa, como ha sido documentado en otros modelos de HTO (Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009, Wax et al. 2008), aunque contrariamente en la patología glaucomatosa humana no parece ser característica la **infiltración retiniana masiva de células T** (Tezel 2013). Este último hecho no

es suficiente para descartar por completo la implicación de una reacción de tipo adquirido en el glaucoma, ya que la invasión de células T parece ser un evento puntual muy breve, y además no es necesaria una gran infiltración para causar daños severos (Odoardi et al. 2007, Wekerle et al. 1987). Al respecto, en un modelo de glaucoma McKinnon y cols. (McKinnon et al. 2010) documentaron que en ratones knockout para células B y T maduras, se producía una importante respuesta neuroprotectora.

La presencia de moléculas del MHC-II y de células T en el tejido no son los únicos determinantes para el desarrollo de una respuesta inmune de tipo adquirido en la retina. La presencia de moléculas coestimuladoras, el conjunto de citoquinas y quimioquinas del medio y el estado funcional de las CPAs, será lo que medie en el curso de los posibles procesos inflamatorios en el glaucoma (Odoardi et al. 2007, Wekerle et al. 1987). **Las moléculas coestimuladoras**, las cuales son necesarias junto con el MHC-II para activar a las células T, están presentes en la microglía (Aloisi 2001), algo que sin embargo no parece estar del todo claro en los astrocitos (Aloisi et al. 2000b). La expresión del MHC-II en la microglía de nuestros ratones con HTO, junto con la comentada presencia de moléculas coestimuladoras, podría determinar que de manera eficiente estas células pudiesen activar a los linfocitos T (Aloisi et al. 2000b). Además, la microglía parece promover un perfil proinflamatorio o Th1 en las células T (Aloisi et al. 2000b). Si esto fuese así en el curso de la patología glaucomatosa, estas células por tanto podrían participar y exacerbar el daño neuronal asociado. Por el contrario, los astrocitos se han relacionado frecuentemente con un patrón antiinflamatorio o Th2 (Aloisi et al. 2000b). En el glaucoma, este hecho junto a la ausencia controvertida de moléculas coestimuladoras, podría por un lado paliar los efectos de una posible respuesta de tipo Th1 y por otro inducir la anergia y/o muerte de las células T que hubiesen infiltrado el parénquima, pudiendo por tanto jugar los astrocitos un papel neuroprotector en esta patología. En base a ello, que en los ojos-HTO la microglía, en comparación con los astrocitos, sea la célula que presente mayores niveles de MHC-II podría estar en claro acuerdo con una respuesta Th1 o de tipo proinflamatorio. Sin embargo, en los ojos contralaterales, que los astrocitos presenten una expresión de las moléculas del MHC-II similar a la de la microglía, podría estar intentando paliar una respuesta de tipo

proinflamatorio desencadenado por la microglía, promover señales Th2 y de esta forma favorecer la supervivencia neuronal.

En base a todo lo anterior, la retina del ratón parece tener diferentes poblaciones celulares con propiedades de CPAs. A pesar de ello, dada la ausencia de vasos linfáticos en la retina, no queda claro cómo los antígenos retinianos son capaces de alcanzar el torrente sanguíneo, hecho documentado en el suero hemático de sujetos glaucomatosos (*Dervan et al. 2010, Joachim et al. 2008, Maruyama et al. 2000, Tezel et al. 1998, Tezel et al. 1999a, Yang et al. 2001b*). Algunos estudios lo vinculan a la presencia en el espacio perivascular de unas células con una potente capacidad presentadora del antígeno, debido a su expresión constitutiva de moléculas del MHC-II y moléculas coestimuladoras (*Aloisi et al. 2000b, Graeber et al. 1992*), pudiendo ser estas células la primera línea de limpieza del tejido nervioso (*Graeber et al. 1992, Weller 1998*). En el ratón Swiss aparecían unas células robustas Iba-1+/MHC-II+ sobre las paredes de los vasos, lo que podría concordar con los estudios mencionados. Estas células podrían bien migrar hacia los ganglios linfáticos para reactivar a los linfocitos T o bien ponerse en contacto con las células T inactivas que circulan por los vasos sanguíneos de manera habitual, siendo éste un posible mecanismo que podría poner en marcha procesos inflamatorios mediados por células T.

Además de la hipotética ausencia de CPAs en el tejido nervioso, que ya hemos visto que no es tal, otro mecanismo que dota a la retina de un privilegio inmune es la presencia de la **barrera hematorretiniana**, la cual evita la entrada de células inmunes desde el torrente sanguíneo al parénquima nervioso. En condiciones normales, esta barrera se mantiene, al menos en parte, por las funciones de barrera que poseen las células gliales (*Nimmerjahn et al. 2005, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009*). En el glaucoma sin embargo, la microglía y los astrocitos reactivos liberan ciertas citoquinas (*Tezel et al. 2001a, Tezel and Wax 2000a*), que junto al incremento de MMPs secretadas por los astrocitos de la cabeza del nervio óptico, participarán en el fallo de la barrera hematorretiniana interna (*Agapova et al. 2001, Golubnitschaja-Labudova et al. 2000, Yan et al. 2000*). La reactivación crónica de las células Iba-1+ en la región de la CFR-EPR en el curso del glaucoma, similar a lo que ocurre en otras patologías (*Ng and Streilein 2001*) podría potenciar un ambiente proinflamatorio y un

incremento de quimioquinas. Consecuentemente, podrían aparecer cambios morfológicos y/o funcionales del EPR como ya hemos visto (Ma et al. 2009, Xu et al. 2009), favoreciéndose la entrada de células inmunes a la retina desde el torrente sanguíneo (Combadiere et al. 2007). En nuestro trabajo, esto podría explicar la presencia de **células de morfología redondeada Iba-1+/MHC-II+/CD68+** en la región de la CFR-EPR y también en la CFN-CCG en estrecha relación con los vasos sanguíneos en los ojos-HTO. Esto está en acuerdo con las observaciones de otros modelos de glaucoma (Howell et al. 2012, Tezel and the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group 2009) y se sabe que esta infiltración celular podrían participar en la degeneración glaucomatosa, ya que una reducción de este tipo de células ha sido relacionada con la mejora de la supervivencia neuronal en esta patología (Howell et al. 2012). Así pues, no sólo la respuesta de las células gliales de la retina podría estar mediando en los procesos neuroinflamatorios en el curso de la patología glaucomatosa. Además, al igual que estas células del torrente tiene capacidad para entrar al parénquima, se ha visto que la microglía del ES es capaz de salir de él a través de los vasos de la retina, la coroides o el cuerpo ciliar (Raoul et al. 2008), siendo ésta otra posible vía de conexión entre el tejido neural y las células T que podría poner en marcha una respuesta inmune adquirida.

Que las células Iba-1+ en los ojos-HTO de nuestro modelo, especialmente las de la CFN-CCG y de la CFR-EPR, mostraran una marcada inmunorreacción CD68+, a diferencia de los ojos del grupo control, evidenciaba el carácter macrofágico activo de esta microglía (Joly et al. 2009). Al comienzo de la patología glaucomatosa, una actividad macrofágica de la microglía, junto con la producción de sustancias antiinflamatorias, como el TGF- β , podría tratar de reestablecer la homeostasis del tejido. Sin embargo, esta reactivación glial crónica en el glaucoma podría mediar la secreción de sustancias proinflamatorias, como el TNF- α o la iNOS (Napoli and Neumann 2009, Tezel et al. 2001a, Tezel and Wax 2000a, Yan et al. 2000), y por tanto exacerbar el daño neuronal. En los ojos contralaterales, a pesar de la expresión de las moléculas del MHC-II en la población microglial, que hablaría en favor de un proceso inflamatorio en curso, sin embargo, la baja expresión del CD68 podría estar en acuerdo con una reactivación microglial en estos ojos no asociada quizás en este momento a un perfil proinflamatorio. Este hecho de nuevo podría apoyar una reactivación microglial con un papel neuroprotector en los ojos contralaterales.

5.5 Afectación del ojo contralateral normotenso

Hasta el momento, los estudios en modelos unilaterales de HTO han empleado el ojo contralateral, normotenso, de forma rutinaria como un ojo control. Este hecho se fundamenta en que el incremento de la PIO es uno de los factores de riesgo más prevalentes de la patología glaucomatosa, y por tanto, un ojo con valores normales de PIO no tendría por qué desarrollar procesos neurodegenerativos. Sin embargo, según algunos autores el incremento de la PIO no parece ser clave en los cambios incipientes de esta patología (Bosco *et al.* 2011) e incluso ha de tenerse en cuenta que a pesar de normalizarse los valores de PIO, es muy común que la degeneración del nervio óptico en los paciente glaucomatosos continúe avanzando (Leske *et al.* 2003). Todo ello podría hacer pensar que posiblemente existan otros mecanismos implicados en el proceso neurodegenerativo del glaucoma, que podrían ser secundarios al incremento inicial de la PIO. Teniendo en cuenta que el glaucoma humano suele ser una degeneración bilateral, aunque asimétrica en el tiempo, si consideramos la existencia de una posible relación entre ambos ojos del individuo, quizás estos mecanismos a los que hemos hecho mención, sean los que de manera incipiente jueguen un papel claro en la afectación asimétrica del ojo contralateral.

En los estudios realizados en nuestro modelo experimental de HTO, los ojos contralaterales no presentaban evidencias de afectación neuronal: existían unos registros electrofisiológicos normales, una distribución y número de CGRs similar a la de los animales control (Salinas-Navarro *et al.* 2009a) así como la ausencia de CGRs NF-200+ y de células Iba-1+ en bastón, asociadas estas últimas clásicamente a procesos de degeneración axonal (del Río Hortega 1920, del Río Hortega 1932). Sin embargo, a pesar de todo ello se observaba una reactivación de la glía retiniana. Característicamente, aparecían alteraciones morfológicas en la macro y la microglía, una migración y un aumento del número de las células microgliales y un incremento en la expresión de marcadores asociados con el sistema inmune, como el MHC-II. De manera similar a nuestros resultados, otros estudios de HTO unilateral han documentado una reactivación macroglial (Kanamori *et al.* 2005, Ramírez *et al.* 2010) y microglial (Wang *et al.* 2000a) en las retinas contralaterales, lo que también se ha podido observar en otros modelos de muerte de las CGRs, como la axotomía (Galindo-Romero

et al. 2013, Sobrado-Calvo et al. 2007) o en el aplastamiento del nervio óptico (*Bodeutsch et al. 1999, Macharadze et al. 2009, Panagis et al. 2005*) y también incluso en modelos de muerte de fotorreceptores (*Joly et al. 2009*). Por tanto, esta respuesta glial temprana probablemente podría desencadenarse por la presencia de señales de estrés potencialmente dañinas, pero incipientes a cualquier evento neurodegenerativo, lo que parece concordar con los resultados que se han observado en modelos congénitos de HTO (*Bosco et al. 2011, Fan et al. 2010*). La idea que parece desprenderse de nuestros resultados y del resto de estudios, es que en el ojo contralateral podrían estar apareciendo de manera precoz ciertos cambios nocivos. Éstos podrían ser secundarios a señales derivadas de los ojos-HTO y, aunque no en este momento, serían capaces de llegar a comprometer la supervivencia neuronal. Este hecho, podría dar explicación a por qué el glaucoma humano comienza afectando generalmente uno de los dos ojos y posteriormente se produce una afectación bilateral. Sin embargo, la pregunta que subyace es cómo el ojo contralateral podría estar recibiendo la información desde el ojo-HTO.

La reactivación de las células gliales en el ojo contralateral, al ser éstas las encargadas de mantener el entorno neuronal, podría ser un intento de restaurar la homeostasis del tejido y evitar de esta forma un posible daño neuronal. Se ha visto que ante cualquier alteración del sistema nervioso, la microglía del cerebro es capaz de reactivarse (*Panagis et al. 2005*). Considerando este hecho, los cambios del ojo contralateral podrían estar asociados a una reactivación general de la microglía dada su gran sensibilidad, aunque sin embargo, existen otros mecanismos que podrían explicar la activación glial de los ojos contralaterales.

Al igual que en la axotomía (*Galindo-Romero et al. 2013, Sobrado-Calvo et al. 2007*) y en el aplastamiento del nervio óptico (*Bodeutsch et al. 1999, Panagis et al. 2005*), nuestro modelo de HTO se caracteriza por un daño axonal. En el glaucoma, se produce una degeneración retrógrada progresiva de los axones de las CGRs desde la zona del daño hasta otras regiones más distales en la vía óptica (*Buckingham et al. 2008, Crish et al. 2010, Fu and Sretavan 2010, Howell et al. 2007, Schlamp et al. 2006*). Teniendo esto en cuenta, el **quiasma óptico**, donde se produce la decusación de los axones procedentes de ambos nervios ópticos, podría ser un lugar de

comunicación entre los dos ojos (*Bodeutsch et al. 1999, Panagis et al. 2005, Perry and Cowey 1979*). Las alteraciones axonales que se suceden durante los procesos neurodegenerativos unilaterales podrán generar señales de daño, que a nivel quiasmático podrían llegar a los axones del ojo contralateral inicialmente no afectado.

Por otro lado, durante el desarrollo embrionario de ciertas especies, entre ellas los murinos, se ha descrito la existencia de **proyecciones retino-retinales**, es decir, fibras de las CGRs procedentes de un ojo que cruzan el quiasma óptico para dirigirse a la retina contralateral (*Bunt and Lund 1981, Thanos 1999, Toth and Straznicky 1989*). Aunque este mecanismo ha sido empleado por otros autores para discutir la afectación de los ojos contralaterales ante un daño unilateral de aplastamiento del nervio óptico (*Bodeutsch et al. 1999, Panagis et al. 2005*), dado que el número de estas proyecciones en el adulto parece ser extremadamente pequeño (*Macharadze et al. 2009, Müller and Hollander 1988*), parece poco probable que pudieran ser el origen de la respuesta de los ojos contralaterales. En cambio, las proyecciones de la retina afectada que alcanzan el **colículo superior** contralateral podrían a través de las fibras ipsilaterales ser las responsables de transmitir de manera anterógrada la información al otro ojo (*Macharadze et al. 2009*).

Otra posible explicación a la afectación contralateral podría asociarse a **mecanismos neurogénicos**. Se ha visto cómo en modelos de artritis reumatoide unilateral desarrollados en rata, existe una propagación de la respuesta inflamatoria hacia los nervios contralaterales (*Donaldson et al. 1995, Kelly et al. 2007*). Además, esta señalización hacia las fibras no lesionadas contralaterales parece afectar de manera selectiva sólo a las fibras homólogas (*Kolston et al. 1991*). En base a ello y si así fuese en el ojo, las CGRs contralaterales en nuestro modelo de HTO correrían la misma suerte que las CGRs de los ojos-HTO, aunque de forma más tardía.

Teniendo en cuenta el **carácter inmune** que envuelve a la patología glaucomatosa (*Tezel 2013*), parecería lógico pensar que una respuesta inflamatoria general puesta en marcha por el ojo-HTO, pudiera ser responsable del incremento de las moléculas del MHC-II en las células gliales de los ojos contralaterales. En el suero hemático de sujetos glaucomatosos se ha observado la presencia de antígenos retinianos, a pesar de la ausencia

de un sistema linfático como tal en la retina (*Dervan et al. 2010, Joachim et al. 2008, Maruyama et al. 2000, Tezel et al. 1998, Tezel et al. 1999a, Yang et al. 2001b*). También, algunos estudios en quimeras han detectado la presencia de microglía en los vasos del nervio óptico con contenido fagocitado en su interior (*Joly et al. 2009*); estas células podrían haber abandonado la retina a través del torrente sanguíneo, llegar al bazo, y actuar potencialmente como CPAs (*Karlstetter et al. 2010*). Coincidiendo con nuestros resultados, otro modelo de HTO en rata mediante fotocoagulación láser, detectó un aumento de la expresión del OX-6 (MHC-II) en la microglía OX-42+ de los ojos contralaterales (*Wang et al. 2000a*). Esta expresión aparecía a las 2 horas tras los impactos del láser, pero sin embargo no era ni generalizada ni se mantenía en el tiempo, contrariamente a lo que ocurría en nuestro modelo. Wang y cols. (*Wang et al. 2000a*) postularon que dada la rápida normalización de la expresión del MHC-II, ésta podría estar asociada al daño que sufren los ojos durante la manipulación quirúrgica. Sin embargo en nuestro modelo, 15 días después del tratamiento láser se observaba una reacción MHC-II+ marcada, relacionada posiblemente con el curso de procesos neuroinflamatorios. Por tanto, las diferencias encontradas por estos autores en comparación con nuestros ratones, podrían deberse a la diferencia del modelo empleado o bien a la diferencia de especies.

El desarrollo de respuestas inflamatorias convencionales en el sistema nervioso podría poner en riesgo su funcionalidad; por ello se han desarrollado mecanismos especiales que modulan las respuestas que se producen en presencia de antígenos en el tejido nervioso. Esto se conoce con el nombre de inmunoprivilegio y el ojo está considerado un lugar que goza de este privilegio inmune. Se sabe que los antígenos localizados en regiones inmunoprivilegiadas, como es el caso de la cámara anterior, interaccionan de manera inusual con las células T, produciéndose una tolerancia en lugar de una respuesta destructora. Esta respuesta inusual del sistema inmune se denomina Desviación Inmune Asociada a la Cámara Anterior (*Nieder Korn et al. 1981*), conocida universalmente por su acrónimo en inglés ACAID. En resumen, esta respuesta se caracteriza por la aparición de linfocitos T reguladores capaces de suprimir una reacción de hipersensibilidad retardada frente al antígeno que indujo el **ACAID** (*Nieder Korn and Streilein 1983*). Muchos estudios han postulado que el ACAID es un mecanismo que no se puede suprimir, sin embargo, se ha

visto recientemente que ante un daño unilateral producido por impactos láser en la retina (Qiao *et al.* 2009), el aplastamiento del nervio óptico o lesiones unilaterales en otras regiones de la vía óptica (Stein-Streilein *May 06, 2012*), curiosamente se alteraba no sólo el ACAID del ojo dañado, sino también el del ojo contralateral no afectado. Estos estudios responsabilizaban a la sustancia P, que es un péptido neuroinflamatorio, de jugar un papel clave en la transmisión precoz de señales inflamatorias desde el ojo dañado al ojo contralateral, observándose en éste último alteraciones del privilegio inmune asociadas a una disrupción del ACAID (Lucas *et al.* 2012). Los resultados derivados de nuestro modelo unilateral de HTO, donde ambos ojos parecían presentar cambios relacionados con el sistema inmune, podrían apoyarse en la disrupción del ACAID de manera bilateral.

En resumen, considerando el fallo bilateral del ACAID ante daños unilaterales, y dada la expresión del MHC-II en las células gliales en los ojos contralaterales, el sistema inmune podría ser un mecanismo que explicase una posible comunicación entre ambos ojos. Esta implicación aparente del sistema inmune en los ojos contralaterales, que podría estar desencadenada por señales procedentes del ojo-HTO, parece estar participando ya en eventos neuroinflamatorios, que sin embargo son más precoces a la afectación neuronal en estos ojos (Cuenca *et al.* 2010, Salinas-Navarro *et al.* 2009a). Una reactivación glial bilateral, podría ser el resultado de una respuesta a diferentes procesos neurodegenerativos, tanto en las retinas lesionadas como en las retinas contralaterales (Panagis *et al.* 2005). En nuestro modelo de HTO, existía una reactivación glial tanto de los ojos-HTO como de los ojos contralaterales, sin embargo entre ambos existía una diferencia primordial, la ausencia de afectación neuronal en los últimos. Debido a ello, la reactivación glial que se observaba podría estar jugando papeles diferentes en ambos ojos. Ante los eventos neurodegenerativos que ocurren en los ojos-HTO de nuestros ratones, la activación crónica de las células gliales posiblemente podría estar exacerbando la muerte neuronal y por tanto jugar un papel neurotóxico en el curso de la patología glaucomatosa. Sin embargo, la reactivación de las células gliales en los ojos contralaterales, dada la ausencia aparente de afectación neuronal, posiblemente esté mediando ante otras señales que pudieran comprometer la homeostasis del tejido y consecuentemente poner en riesgo la supervivencia neuronal.

Conclusiones

6 Conclusiones

Este proyecto de tesis aborda, a través de un modelo experimental de hipertensión ocular unilateral en el ratón albino Swiss, la implicación de la glía retiniana en la neurodegeneración óptica glaucomatosa. A la vista de los resultados concluimos que:

1. En los ratones albinos Swiss la fotocoagulación láser de las estructuras limbares es un método fiable y reproducible para inducir hipertensión ocular. Este modelo genera incrementos de presión intraocular que, a pesar de su carácter agudo, produce efectos similares a los cambios crónicos asociados a la neuropatía óptica glaucomatosa humana.

2. A los 15 días del tratamiento láser, en los ojos con hipertensión ocular se produce una afectación de las células ganglionares de la retina, evidenciada por la presencia de somas y dendritas de estas células con un inmunomarcaje NF-200+.

3. A los 15 días del tratamiento láser, tanto en los ojos con hipertensión ocular como en los ojos contralaterales no tratados, se produce una gliosis generalizada de la población macro y microglial de la retina.

4. En los ojos con hipertensión ocular se observa una gliosis astrocitaria no proliferativa caracterizada por cambios morfológicos celulares y por un incremento global de la GFAP. Las células de Müller también aumentan la expresión de la GFAP como signo de reactivación.

5. En los ojos con hipertensión ocular se observa una gliosis proliferativa de las células Iba-1+ caracterizada por la retracción de las prolongaciones celulares, lo que se correlaciona con la reducción del dominio espacial de estas células en la retina.

6. En los ojos contralaterales normotensos no tratados se produce una gliosis generalizada semejante a la de los ojos con hipertensión ocular, a pesar de no existir evidencias de afectación neuronal.

7. Las células Iba-1+ en bastón de la capa de fibras del nervio óptico-capas de células ganglionares y las células redondeadas Iba-1+ de la capa de fibras del nervio óptico-capas de células ganglionares y de la capa de fotorreceptores, se restringen exclusivamente a los ojos con hipertensión ocular.

8. Las células Iba-1+ de los ojos con hipertensión ocular experimentan un incremento global de la expresión del CD68. La mayor expresión CD68+ se localiza preferentemente en las células en bastón de la capa de fibras del nervio óptico-capas de células ganglionares y en las células de apariencia redondeada de la capa de fibras del nervio óptico-capas de células ganglionares y de la capa de fotorreceptores.

9. Tanto en los ojos con hipertensión ocular como en los ojos contralaterales normotensos no tratados se observa un aumento similar y generalizado de la expresión de las moléculas del MHC-II en la población Iba-1+. En la macroglía GFAP+ de los ojos contralaterales no tratados esta expresión se localiza preferentemente en los astrocitos, quedando restringida a las células de Müller en los ojos con hipertensión ocular.

10. En los ojos contralaterales normotensos no tratados, sin signos neurodegenerativos, la expresión del MHC-II en las células Iba-1+ y en los astrocitos GFAP+ podría estar en relación con una respuesta inmune que trate de restaurar la homeostasis del tejido. Por el contrario, en los ojos con hipertensión ocular con presencia de afectación neuronal, el incremento de la expresión del MHC-II en las células Iba-1+ y las células de Müller GFAP+, podría estar asociado a una reactivación glial exacerbada asociada a procesos neuroinflamatorios de tipo neurotóxico.

11. El aumento de la expresión del MHC-II y del CD68 en la glía de la retina y la presencia de células redondeadas mononucleadas Iba-1+/MHC-II+/CD68+ en el parénquima retiniano, que podrían estar infiltradas desde el torrente sanguíneo, parece apoyar la implicación del sistema inmune en la fisiopatología glaucomatosa en este modelo de hipertensión ocular, no sólo en los ojos con hipertensión ocular sino también en los ojos contralaterales no tratados.

12. En el modelo de hipertensión ocular unilateral inducida por láser utilizado en este estudio, el ojo contralateral no debe ser empleado como control.

Conclusions

6 Conclusions

To summarize, this thesis project addressed the involvement of retinal glia in glaucomatous optic neurodegeneration through an animal model of unilateral ocular hypertension. In view of the results we conclude that:

- 1.** In albino Swiss mice laser photocoagulation of limbal structures is a reliable and reproducible method to induce ocular hypertension. This model generates sharp increases in intraocular pressure, a process which despite its acute character produces similar changes to the chronic ones in glaucomatous optic neuropathy.
- 2.** In the hypertensive eyes retinal ganglion cell damage occurs 15 days after the laser treatment, as signaled by NF-200+ immunostaining in the somas and dendrites of these cells.
- 3.** Both hypertensive eyes and contralateral eyes experience a gliosis of the macro and microglial populations of the retina 15 days after the laser treatment.
- 4.** In hypertensive eyes a non-proliferative astrocytic gliosis is observed. It is characterized by morphological cellular changes and by an overall increase in the GFAP expression. Müller cells also increase the GFAP expression as a sign of activation.
- 5.** In hypertensive eyes a proliferative gliosis of Iba-1+ cells, characterized by processes retraction, was observed, which correlated with the reduction of the spatial domain of these cells in the retina.
- 6.** In the contralateral normotensive untreated eyes widespread gliosis similar to the hypertensive eyes, despite the absence of evidence of neuronal involvement, occurs.
- 7.** Rod-like Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and rounded Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer are restricted exclusively to hypertensive eyes.

8. Iba-1+ cells in hypertensive eyes experience an increase of CD68 expression. Preferentially, a greater CD68 expression was found in rod-like Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and rounded Iba-1+ cells in the nerve fiber layer-ganglion cell layer and in the photoreceptor layer.

9. Both hypertensive eyes and untreated contralateral normotensive eyes show a similar and widespread increase of MHC-II expression in Iba-1+ population. In GFAP+ macroglia this expression preferentially localizes in astrocytes of contralateral untreated eyes, whereas it remains restricted to Müller cells in hypertensive eyes.

10. In contralateral normotensive untreated eyes without neurodegenerative signs, MHC-II expression in Iba-1+ cells and GFAP+ astrocytes could be associated with an immune response that attempts to restore the homeostasis of the tissue. In contrast, in hypertensive eyes displaying the presence of neuronal affectation, the observed increased expression of MHC II on Iba-1+ cells and GFAP+ Müller cells could be related to a glial exacerbated reactivation associated with neurotoxic neuroinflammatory processes.

11. The increased MHC-II and CD68 expression in retinal glia and the presence of rounded mononuclear Iba-1+/MHC-II+/CD68+ cells in retinal parenchyma, that could have infiltrated from the bloodstream, appears to provide evidence for the involvement of the immune system in glaucomatous pathophysiology in this model of OHT, not only in the eyes with ocular hypertension but also in the contralateral untreated eyes.

12. In the unilateral laser-induced ocular hypertension model used in the present study, resort to the contralateral eye should not be used as a control.

Bibliografía

7 Bibliografía

A

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7:41-53

Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42:1033-1041

Achúcarro N (1911a) Neuroglia y elementos intersticiales patológicos del cerebro, impregnados por los métodos de reducción de plata o por sus modificaciones. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas IX*:161-179
 Achúcarro N (1914) Contribución al estudio gliotectónico de la corteza cerebral. el asta de Ammon y la fasci dentata. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XII*:229-272

Achúcarro N (1911b) Algunos datos histopatológicos obtenidos con el procedimiento del tanino y plata amoniaca. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas IX*:269-288

Achúcarro N (1913) Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia y en particular de la neuroglia de la corteza cerebral humana. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XI*:187-217

Achúcarro N, Gayarre M (1914a) Contribución al estudio de la neuroglia en la corteza de la demencia senil y su participación en la alteración celular de Alzheimer. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XII*:63-83

Achúcarro N, Gayarre M (1914b) La corteza cerebral en la demencia paralítica con el nuevo método del oro y sublimado de Cajal. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XII*:1-38

Agapova OA, Ricard CS, Salvador-Silva M, Hernandez MR (2001) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia* 33:205-216

Agar A, Yip SS, Hill MA, Coroneo MT (2000) Pressure related apoptosis in neuronal cell lines. *J Neurosci Res* 60:495-503

Agarwal R, Gupta S, Agarwal P, Saxena R, Agrawal S (2009) Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian J Ophthalmol* 57:257-266

Agudo M, Perez-Marin MC, Lonngren U, Sobrado P, Conesa A, Canovas I, Salinas-Navarro M, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M (2008) Time course profiling of the retinal transcriptome after optic nerve transection and optic nerve crush. *Mol Vis* 14:1050-1063

Agudo M, Perez-Marin MC, Sobrado-Calvo P, Lonngren U, Salinas-Navarro M, Canovas I, Nadal-Nicolas FM, Miralles-Imperial J, Hallbook F, Vidal-Sanz M (2009) Immediate upregulation of proteins

belonging to different branches of the apoptotic cascade in the retina after optic nerve transection and optic nerve crush. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:424-431

Ahmed FA, Hegazy K, Chaudhary P, Sharma SC (2001) Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Res* 913:133-139

Ahmed F, Brown KM, Stephan DA, Morrison JC, Johnson EC, Tomarev SI (2004) Microarray analysis of changes in mRNA levels in the rat retina after experimental elevation of intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1247-1258

Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003a) Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4314-4320

Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003b) Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp Eye Res* 77:681-686

Akiyama H, McGeer PL (1990) Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol* 30:81-93

Al-Chalabi A, Miller CC (2003) Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 25:346-355

Alarcon R, Fuenzalida C, Santibanez M, von Bernhardt R (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem* 280:30406-30415

Alarcon-Martinez L, de La Villa P, Salinas-Navarro M, García-Ayuso D, Cánovas I, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2007) Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Functional effects in the albino mice retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:E-Abstract 4354

Albini TA, Wang RC, Reiser B, Zamir E, Wu GS, Rao NA (2005) Microglial stability and repopulation in the retina. *Br J Ophthalmol* 89:901-903

Albon J, Purslow PP, Karwatowski WSS, Easty DL (2000) Age related compliance of the lamina cribrosa in human eyes. *Br J Ophthalmol* 84:318-323

Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734-744

Allen DM, Hallows TE (1997) Solar pruning of retinal rods in albino rainbow trout. *Vis Neurosci* 14:589-600

Alliot F, Lecain E, Grima B, Pessac B (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1541-1545

Aloisi F, De Simone R, Columba-Cabezas S, Penna G, Adorini L (2000a) Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. *J Immunol* 164:1705-1712

Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000b) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147

Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36:165-179

Aloisi F (2005) Cytokine production. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, pp 285-301

Alward WLM (2000) *Glaucoma: los requisitos en oftalmología*. Madrid; Elsevier España SA, 260 pp.

Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14

Anderson DR, Hendrickson A (1974) Effect of Intraocular Pressure on Rapid Axoplasmic Transport in Monkey Optic Nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13:771-783

Anderson VC, Lenar DP, Quinn JF, Rooney WD (2011) The blood-brain barrier and microvascular water exchange in Alzheimer's disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011:615829

Andriezen WL (1893) The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J* 2:227-230

Anezary L, Medina JI, Sanchez-Nogueiro J, Lopez-Gallardo M, Prada C (2001) Shape diversity among chick retina Müller cells and their postnatal differentiation. *J Comp Neurol* 438:32-49

Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA (1989) An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4544-4548

Ashwell K (1989) Development of microglia in the albino rabbit retina. *J Comp Neurol* 287:286-301

Ashwell K (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55:219-230

Ashwell K (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 58:1-12

Ashwell KW, Hollander H, Streit W, Stone J (1989) The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci* 2:437-448

Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Garcia-Aviles A, Lafuente MP, Rodriguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 184:767-777

Avwenagha O, Bird MM, Lieberman AR, Yan Q, Campbell G (2006) Patterns of expression of brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B mRNAs and distribution and ultrastructural localization of their proteins in the visual pathway of the adult rat. *Neuroscience* 140:913-928

B

Badea TC, Nathans J (2004) Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol* 480:331-351

Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G (2002) Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* 82:1311-1329

Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P (1999) Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res* 55:578-587

Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW (1994) Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci* 14:846-856

Balasingam V, Dickson K, Brade A, Yong VW (1996) Astrocyte reactivity in neonatal mice: apparent dependence on the presence of reactive microglia/macrophages. *Glia* 18:11-26

Balestrino M, Somjen GG (1988) Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. *J Physiol* 396:247-266

Balkema GW, Drager UC (1985) Light-dependent antibody labelling of photoreceptors. *Nature* 316:630-633

Balkema GW, Drager UC (1990) Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Vis Neurosci* 4:595-604

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13

Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreutzberg GW (1993) Detection of lysosomal cysteine proteinases in microglia: flow cytometric measurement and histochemical localization of cathepsin B and L. *Glia* 7:183-191

Banati RB, Graeber MB (1994) Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci* 16:114-127

Baptiste D, Powell K, Jollimore C, Hamilton C, LeVatte T, Archibald M, Chauhan B, Robertson G, Kelly M (2005) Effects of minocycline and tetracycline on retinal ganglion cell survival after axotomy. *Neuroscience* 134:575-582

Baratas A (2006) Santiago Ramón y Cajal y su escuela: paradigma del desarrollo científico español del primer tercio del siglo XX. *Boletín de la Institución Libre de Enseñanza* 63/64:175-188

Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW (2000) Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3561-3568

Barber AJ (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:283-290

Barna BP, Estes ML, Jacobs BS, Hudson S, Ransohoff RM (1990) Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor alpha. *J Neuroimmunol* 30:239-243

Barnett NL, Pow DV (2000) Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:585-591

Barnstable CJ, Drager UC (1984) Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11:847-855

Barnum SR (1999) Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. *Mol Med* 5:569-582

Barron KD (1995) The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134:57-68

Bausher LP (1995) Endothelins inhibit cyclic AMP production in rabbit and human ciliary processes. *J Ocul Pharmacol Ther* 11:135-143

Bayer AU, Neuhardt T, May AC, Martus P, Maag K, Brodie S, Lütjen-Drecoll E, Podos SM, Mittag T (2001) Retinal morphology and ERG response in the DBA/2NNia mouse model of angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1258-1265

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (1998) Neuronas y glía. In: Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (eds) *Neurociencia. Explorando el cerebro*. Masson-William & Wilkins, Barcelona, pp 22-45

Beart PM, O'Shea RD (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* 150:5-17

Behzadian MA, Wang X, Jiang B, Caldwell RB (1995) Angiostatic role of astrocytes: Suppression of vascular endothelial cell growth by TGF- β and other inhibitory factor (s). *Glia* 15:480-490

Behzadian MA, Wang X, Shabrawey M, Caldwell RB (1998) Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF- β . *Glia* 24:216-225

Bell MD, Lopez-Gonzalez R, Lawson L, Hughes D, Fraser I, Gordon S, Perry VH (1994) Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J Neurocytol* 23:605-613

BenEzra D, Chan CC (1987) S-100 antigenic determinants in human retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 225:151-153

Bergmann K (1857) Notiz über einige Strukturverhältnisse des Cerebellum und Rückenmarks. *Z Med* 8:360-363

Bernstein SL, Koo JH, Slater BJ, Guo Y, Margolis FL (2006) Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression. *Mol Vis* 12:147-155

Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295:1070-1073

Berson DM (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci* 26:314-320

Berson DM, Castrucci AM, Provencio I (2010) Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol* 518:2405-2422

Bertolotto A, Caterson B, Canavese G, Migheli A, Schiffer D (1993) Monoclonal antibodies to keratan sulfate immunolocalize ramified microglia in paraffin and cryostat sections of rat brain. *J Histochem Cytochem* 41:481-487

Bertolotto A, Manzardo E, Iudicello M, Guglielmone R, Riccio A (1995) Keratan sulphate is a marker of differentiation of ramified microglia. *Brain Res Dev Brain Res* 86:233-241

Bertolotto A, Agresti C, Castello A, Manzardo E, Riccio A (1998) 5D4 keratan sulfate epitope identifies a subset of ramified microglia in normal central nervous system parenchyma. *J Neuroimmunol* 85:69-77

Beynon SB, Walker FR (2012) Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience* 225:162-171

Bhuyan KC, Bhuyan DK (1977) Regulation of hydrogen peroxide in eye humors. Effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye. *Biochim Biophys Acta* 497:641-651

Bianchini D, De Martini I, Cadoni A, Zicca A, Tabaton M, Schenone A, Anfosso S, Akkad Wattar AS, Zaccheo D, Mancardi GL (1992) GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. *Brain Res* 570:209-217

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci* 30:596-602

Biedermann B, Bringmann A, Reichenbach A (2002) High-affinity GABA uptake in retinal glial (Müller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency. *Glia* 39:217-228

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43:429-435

Bignami A, Dahl D (1979) The radial glia of Müller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28:63-69

Bignami A (1984) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in Müller glia. Immunofluorescence study of the goldfish retina. *Brain Res* 300:175-178

- Bignami A (1995) Glial types, gliogenesis, and extracellular matrix in mammalian CNS. In: Vernardakis A, Roots BI (eds) *Neuron-Glia interactions during phylogeny*. Vol. I. Phylogeny and ontogeny of glial cells. Humana Press, pp 3-39
- Bill A, Sperber GO (1990) Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye (Lond)* 4 (Pt 2):319-325
- Bizzi A, Schaetzle B, Patton A, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1991) Axonal transport of two major components of the ubiquitin system: free ubiquitin and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP 9.5. *Brain Res* 548:292-299
- Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Cell Tissue Res* 85:145-157
- Bodeutsch N, Siebert H, Dermon C, Thanos S (1999) Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J Neurobiol* 38:116-128
- Bodeutsch N, Thanos S (2000) Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes. *Glia* 32:91-101
- Boehm MR, Oellers P, Thanos S (2011) Inflammation and immunology of the vitreoretinal compartment. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10:283-309
- Bok D (1993) The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 17:189-195
- Boland MV, Quigley HA (2007) Risk factors and open-angle glaucoma: classification and application. *J Glaucoma* 16:406-418
- Bolz S, Schuettauf F, Fries JE, Thaler S, Reichenbach A, Pannicke T (2008) K(+) currents fail to change in reactive retinal glial cells in a mouse model of glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:1249-1254
- Bonomi L, Marchini G, Marraffa M, Bernardi P, Morbio R, Varotto A (2000) Vascular risk factors for primary open angle glaucoma: the Egna-Neumarkt Study. *Ophthalmology* 107:1287-1293
- Borgula GA, Karwoski CJ, Steinberg RH (1989) Light-evoked changes in extracellular pH in frog retina. *Vision Res* 29:1069-1077
- Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML (2008) Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1437-1446
- Bosco A, Steele MR, Vetter ML (2011) Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol* 519:599-620
- Bosco A, Crish SD, Steele MR, Romero CO, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ, Vetter ML (2012) Early reduction of microglia activation by irradiation in a model of chronic glaucoma. *PLoS One* 7:e43602

Bouhenni RA, Dunmire J, Sewell A, Edward DP (2012) Animal models of glaucoma. *J Biomed Biotechnol* 2012:692609

Bovolenta P, Liem RK, Mason CA (1984) Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol* 102:248-259

Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43:281-291

Boya J, Calvo J, Prado A (1979) The origin of microglial cells. *J Anat* 129:177-186

Boya J, Calvo J, Carbonell AL (1987) Appearance of microglial cells in the postnatal rat retina. *Arch Histol Jpn* 50:223-228

Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, Borregon A (1991a) A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat* 175:229-236

Boya J, Carbonell AL, Calvo JL, Borregon A (1991b) Microglial cells in the central nervous system of the rabbit and rat: cytochemical identification using two different lectins. *Acta Anat (Basel)* 140:250-253

Boycott BB, Hopkins JM (1981) Microglia in the retina of monkey and other mammals: its distinction from other types of glia and horizontal cells. *Neuroscience* 6:679-688

Braekvelt CR (1985) Further observations on the presence of wandering phagocytes within the teleostean retina. *Anat Anz* 160:45-54

Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63:175-195

Brenner T, Yamin A, Abramsky O, Gallily R (1993) Stimulation of tumor necrosis factor-alpha production by mycoplasmas and inhibition by dexamethasone in cultured astrocytes. *Brain Res* 608:273-279

Brew H, Attwell D (1987) Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327:707-709

Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Faude F, Enzmann V, Wiedemann P, Reichelt W, Reichenbach A (1999a) Human Müller glial cells: altered potassium channel activity in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:3316-3323

Bringmann A, Schopf S, Faude F, Skatchkov SN, Enzmann V, Reichenbach A (1999b) The activity of a transient potassium current in retinal glial (Müller) cells depends on extracellular calcium. *J Hirnforsch* 39:539-550

Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 36:241-249

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397-424

Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A (2009a) Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28:423-451

Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A (2009b) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54:143-160

Bromberg JS, Schachner M (1978) Localization of nervous system antigens in retina by immunohistology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17:920-924

Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271

Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021

Bsibsi M, Bajramovic JJ, Van Duijvenvoorden E, Persoon C, Ravid R, Van Noort JM, Vogt MH (2007) Identification of soluble CD14 as an endogenous agonist for Toll-like receptor 2 on human astrocytes by genome-scale functional screening of glial cell derived proteins. *Glia* 55:473-482

Buchi ER (1992) Cell death in the rat retina after a pressure-induced ischaemia-reperfusion insult: an electron microscopic study. I. Ganglion cell layer and inner nuclear layer. *Exp Eye Res* 55:605-613

Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ (2008) Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 28:2735-2744

Bui BV, Fortune B (2004) Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *J Physiol (Lond)* 555:153-173

Bunt SM, Lund RD (1981) Development of a transient retino-retinal pathway in hooded and albino rats. *Brain Res* 211:399-404

Buschini E, Piras A, Nuzzi R, Vercelli A (2011) Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol* 95:14-25

Bussow H (1980) The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res* 206:367-378

C

Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Piña Y, Hernandez EP, Cousins SW (2005) Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Müller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 81:38-47

Calvo JL, Carbonell AL, Boya J (1990) Coexpression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes of the adult rat optic nerve. *Brain Res* 532:355-357

Campbell IL (1998) Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. *Brain Res Brain Res Rev* 26:327-336

Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J (2012) Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 225:65-75

Cao W, Wen R, Li F, Cheng T, Steinberg RH (1997) Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1358-1366

Caprioli J, Spaeth GL (1985) Comparison of the optic nerve head in high- and low-tension glaucoma. *Arch Ophthalmol* 103:1145-1149

Cardenas H, Bolin LM (2003) Compromised reactive microgliosis in MPTP-lesioned IL-6 KO mice. *Brain Res* 985:89-97

Carotti S, Morini S, Corradini SG, Burza MA, Molinaro A, Carpino G, Merli M, De Santis A, Muda AO, Rossi M, Attili AF, Gaudio E (2008) Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transpl* 14:806-814

Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2004a) The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:685-693

Casson RJ, Wood JP, Osborne NN (2004b) Hypoglycaemia exacerbates ischaemic retinal injury in rats. *Br J Ophthalmol* 88:816-820

Castellano B, Gonzalez B, Finsen BR, Zimmer J (1990) Histochemical demonstration of purine nucleoside phosphorylase (PNPase) in microglial and astroglial cells of adult rat brain. *J Histochem Cytochem* 38:1535-1539

Castellano B, Gonzalez B, Dalmau I, Vela JM (1991) Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J Comp Neurol* 311:434-444

Cellerino A, Kohler K (1997) Brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin-4 receptor TrkB is localized on ganglion cells and dopaminergic amacrine cells in the vertebrate retina. *J Comp Neurol* 386:149-160

Cellini M, Possati GL, Profazio V, Sbrocca M, Caramazza N, Caramazza R (1997) Color Doppler imaging and plasma levels of endothelin-1 in low-tension glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* (224):11-13

Cellini M, Strobbe E, Gizzi C, Balducci N, Toschi PG, Campos EC (2012) Endothelin-1 plasma levels and vascular endothelial dysfunction in primary open angle glaucoma. *Life Sci* 91:699-702

Chakrabarti S, Sima AA, Lee J, Brachet P, Dicou E (1990) Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res* 523:11-15

- Chang ML, Wu CH, Chien HF, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2006) Microglia/macrophages responses to kainate-induced injury in the rat retina. *Neurosci Res* 54:202-212
- Chauhan BC, Drance SM (1992) The relationship between intraocular pressure and visual field progression in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230:521-526
- Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly ME, Tremblay F (2002) Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2969-2976
- Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, Yu PK, Reitsamer HA, Kelly ME, Yu DY, Tremblay F, Archibald ML (2004) Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:144-152
- Chen H, Wei X, Cho KS, Chen G, Sappington R, Calkins DJ, Chen DF (2011) Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:36-44
- Chen JZ, Kadlubar FF (2003) A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am J Med* 114:697-698
- Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10:27-39
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149
- Cheunsuang O, Morris R (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 52:228-233
- Chidlow G, Casson R, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2005) Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis* 11:387-396
- Chinnery HR, McLenachan S, Humphries T, Kezic JM, Chen X, Ruitenberg MJ, McMenamin PG (2012) Accumulation of murine subretinal macrophages: effects of age, pigmentation and CX3CR1. *Neurobiol Aging* 33:1769-1776
- Chiu K, Chan HC, Yeung SC, Yuen WH, Zee SY, Chang RC, So KF (2009) Modulation of microglia by Wolfberry on the survival of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension model. *J Ocul Biol Dis Infor* 2:47-56
- Chiu K, Yeung S, So K, Chang RC (2010) Modulation of morphological changes of microglia and neuroprotection by monocyte chemoattractant protein-1 in experimental glaucoma. *Cell Mol Immunol* 7:61-68
- Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y, Kim SS, Kim YS, Joh TH (2006) Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53:92-102
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379

Choi DW, Koh JY, Peters S (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-196

Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182

Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullen CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421-433

Chung HS, Harris A, Kagemann L, Martin B (1999) Peripapillary retinal blood flow in normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 83:466-469

Cocchia D, Polak JM, Terenghi G, Battaglia F, Stolfi V, Gangitano C, Michetti F (1983) Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina--2. Electron microscopical immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:980-984

Coles JA, Marcaggi P, Vega C, Cotillon N (1996) Effects of photoreceptor metabolism on interstitial and glial cell pH in bee retina: evidence of a role for NH₄⁺. *J Physiol* 495 (Pt 2):305-318

Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debre P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen SY, Chauvaud D, Jeanny JC, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F (2007) CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 117:2920-2928

Condorelli DF, Salin T, Dell'Albani P, Mudo G, Corsaro M, Timmusk T, Metsis M, Belluardo N (1995) Neurotrophins and their trk receptors in cultured cells of the glial lineage and in white matter of the central nervous system. *J Mol Neurosci* 6:237-248

Cone FE, Gelman SE, Son JL, Pease ME, Quigley HA (2010) Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection. *Exp Eye Res* 91:415-424

Conforti L, Adalbert R, Coleman MP (2007) Neuronal death: where does the end begin? *Trends Neurosci* 30:159-166

Coombs JL, Van Der List D, Chalupa LM (2007) Morphological properties of mouse retinal ganglion cells during postnatal development. *J Comp Neurol* 503:803-814

Cordeiro MF (2002) Beyond Mitomycin: TGF-beta and wound healing. *Prog Retin Eye Res* 21:75-89

Cotinet A, Goureau O, Thillaye-Goldenberg B, Naud MC, de Kozak Y (1997) Differential tumor necrosis factor and nitric oxide production in retinal Müller glial cells from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Ocul Immunol Inflamm* 5:111-116

Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61-80

Cowey A, Perry VH (1979) The projection of the temporal retina in rats, studied by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 35:457-464

Crafoord S, Dafgard Kopp E, Seregard S, Algvere PV (2000) Cellular migration into neural retina following implantation of melanin granules in the subretinal space. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238:682-689

Crawford Downs J, Roberts MD, Sigal IA (2011) Glaucomatous cupping of the lamina cribrosa: a review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism. *Exp Eye Res* 93:133-140

Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ (2010) Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5196-5201

Crish SD, Dapper JD, MacNamee SE, Balaram P, Sidorova TN, Lambert WS, Calkins DJ (2013) Failure of axonal transport induces a spatially coincident increase in astrocyte BDNF prior to synapse loss in a central target. *Neuroscience* 229:55-70

Croisier E, Graeber MB (2006) Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. *Acta Neuropathol* 112:517-530

Cuadros MA, Navascues J (1998) The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* 56:173-189

Cuadros MA, Santos AM, Martin-Oliva D, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva JL, Navascues J (2006) Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *J Histochem Cytochem* 54:727-738

Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, de la Villa P, Miralles de Imperial J, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2010) Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res* 91:273-285

Cui Q, Tang LS, Hu B, So KF, Yip HK (2002) Expression of trkA, trkB, and trkC in injured and regenerating retinal ganglion cells of adult rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1954-1964

Cursiefen C, Wisse M, Cursiefen S, Junemann A, Martus P, Korth M (2000) Migraine and tension headache in high-pressure and normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 129:102-104

D

da Silva RP, Gordon S (1999) Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. *Biochem J* 338 (Pt 3):687-694

Dahl D, Bignami A (1976) Immunogenic properties of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res* 116:150-157

Dahl D (1981) The vimentin-GFA protein transition in rat neuroglia cytoskeleton occurs at the time of myelination. *J Neurosci Res* 6:741-748

Dahl D, Rueger DC, Bignami A, Weber K, Osborn M (1981) Vimentin, the 57 000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 24:191-196

Dahl D, Crosby CJ, Sethi JS, Bignami A (1985) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol* 239:75-88

Dahlmann B (2007) Role of proteasomes in disease. *BMC Biochemistry* 8:S3

Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B (1998a) Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 8:458-474

Dalmau I, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B (1998b) Expression of purine metabolism-related enzymes by microglial cells in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 398:333-346

Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T (2002) Cytoarchitecture of the Retinal Ganglion Cells in the Rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:587-594

Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T (2003) Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1138-1141

Danias J, Shen F, Kavalarakis M, Chen B, Goldblum D, Lee K, Zamora MF, Su Y, Brodie SE, Podos SM, Mittag T (2006) Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res* 82:219-228

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan W (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758

Davis EJ, Foster TD, Thomas WE (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34:73-78

David JP, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Wattez A, Delaine S, Boniface B, Di Menza C, Delacourte A (1997) Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci Lett* 235:53-56

de Kozak Y, Naud MC, Bellot J, Faure JP, Hicks D (1994) Differential tumor necrosis factor expression by resident retinal cells from experimental uveitis-susceptible and -resistant rat strains. *J Neuroimmunol* 55:1-9

de Kozak Y, Cotinet A, Goureau O, Hicks D, Thillaye-Goldenberg B (1997) Tumor necrosis factor and nitric oxide production by resident retinal glial cells from rats presenting hereditary retinal degeneration. *Ocul Immunol Inflamm* 5:85-94

de Voogd S, Ikram MK, Wolfs RC, Jansonius NM, Hofman A, de Jong PT (2005) Incidence of open-angle glaucoma in a general elderly population: the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 112:1487-1493

Deiters O, Schultze MJS (1865) Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere: mit 6 Tafeln. Fr. Vieweg und Sohn

Deitmer JW (2001) Strategies for metabolic exchange between glial cells and neurons. *Respir Physiol* 129:71-81

del Río Hortega P (1918a) Un nuevo método de coloración histológica e histopatológica. Bol de la Soc Esp de Biol 8(35):19-25

del Río Hortega P (1918b) Sobre la verdadera significación de las células neuróglícas llamadas amiboides. Bol de la Soc Esp de Biol 8:229-243

del Río Hortega P (1919a) El tercer elemento de los centros nerviosos. Bol de la Soc Esp de Biol 9:68-120

del Río Hortega P (1919b) El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. Bol de la Soc Esp de Biol 9:68-82

del Río Hortega P (1919c) El tercer elemento de los centros nerviosos. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. Bol de la Soc Esp de Biol 9:91-103

del Río Hortega P (1919d) El tercer elemento de los centros nerviosos. III. Naturaleza probable de la microglía. Bol de la Soc Esp de Biol 9:108-120

del Río Hortega P (1919e) El tercer elemento de los centros nerviosos. IV. Poder fagocítico y movilidad de la microglía. Bol de la Soc Esp de Biol 9:154-166

del Río Hortega P (1920) Estudios sobre la neuroglía. La microglía y su transformación en células en bastoncillo y cuerpos gránulo-adiposos. Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid 9:1-46

del Río Hortega P (1921a) Estudios sobre la neuroglia. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglia). Bol de la Soc Esp de Biol 21:63-92

del Río Hortega P (1921b) Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. Arch Neurobiol 2:215-255

del Río Hortega P (1921c) El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural 11:213-269

del Río Hortega P (1924) Innovaciones útiles a la técnica de coloración de la microglía. Bol Soc Esp Hist Nat 27(4):199-210

del Río Hortega P, Penfield W (1927) Cerebral cicatrix: the reaction of neuroglia and microglia to brain wounds. Bull John Hopkins Hosp 41:278-303

del Río Hortega P (1928) Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglia. Memorias de la Sociedad Española de Historia Natural 14:5-122

del Río Hortega P (1930) Concepts histogénique, physiologique et physiopathologique de la microglia. Ann Med Psychol 88:347-349

del Río Hortega P (1932) Microglia. In: Penfield W (ed) Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System. Hoeber, New York, pp 482-534

del Río Hortega P (1939) The microglia. *Lancet* 1:103-106

del Río Hortega P, Ojea M, Zimman L (1943) Postmortem changes of microglia in rabbit sacrificed in normal condition. *Arch Histol Norm Pat* 2:203-218

Derouiche A, Rauen T (1995) Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42:131-143

Dervan EW, Chen H, Ho SL, Brummel N, Schmid J, Toomey D, Haralambova M, Gould E, Wallace DM, Prehn JH, O'Brien CJ, Murphy D (2010) Protein macroarray profiling of serum autoantibodies in pseudoexfoliation glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2968-2975

Desagher S, Glowinski J, Premont J (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16:2553-2562

DeVries SH (2001) Exocytosed protons feedback to suppress the Ca²⁺ current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107-1117

Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3978-3983

Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA (1995) Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol* 363:53-68

Dibas A, Yang MH, He S, Bobich J, Yorio T (2008) Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury. *Mol Vis* 14:1770-1783

Dicou E, Nerriere V, Naud MC, de Kozak Y (1994) NGF involvement in ocular inflammation: secretion by rat resident retinal cells. *Neuroreport* 6:26-28

Diem R, Meyer R, Weishaupt JH, Bahr M (2001) Reduction of potassium currents and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT phosphorylation by tumor necrosis factor-(alpha) rescues axotomized retinal ganglion cells from retrograde cell death in vivo. *J Neurosci* 21:2058-2066

Dieterich DC, Trivedi N, Engelmann R, Gundelfinger ED, Gordon-Weeks PR, Kreutz MR (2002) Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur J Neurosci* 15:1433-1443

DiLoreto DAJ, Martzen MR, del Cerro C, Coleman PD, del Cerro M (1995a) Müller cell changes precede photoreceptor cell degeneration in the age-related retinal degeneration of the Fischer 344 rat. *Brain Res* 698:1-14

DiLoreto DJ, Ison JR, Bowen GP, Cox C, del Cerro M (1995b) A functional analysis of the age-related degeneration in the Fischer 344 rat. *Curr Eye Res* 14:303-310

Dixon RG, Eng LF (1981) Glial fibrillary acidic protein in the retina of the developing albino rat: An immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissue. *J Comp Neurol* 195:305-321

Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J, Minvielle F, Versaux-Botteri C (1999) Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:990-995

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716

Dogiel A (1888) Über das Verhalten der nervösen Elemente in der Retina der Ganoiden, Reptilien, Vögel und Säugetiere. *Anat Anz* 3:133-143

Doi M, Uji Y, Yamamura H (1995a) Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J Comp Neurol* 356:368-386

Doi M, Uji Y, Yamamura H (1995b) Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J Comp Neurol* 356:368-386

Donaldson LF, McQueen DS, Seckl JR (1995) Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. *J Physiol* 486 (Pt 2):473-482

Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668

Dowding AJ, Maggs A, Scholes J (1991) Diversity amongst the microglia in growing and regenerating fish CNS: immunohistochemical characterization using FL1, an anti-macrophage monoclonal antibody. *Glia* 4:345-364

Downs JC, Roberts MD, Sigal IA (2011) Glaucomatous cupping of the lamina cribrosa: A review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism. *Exp Eye Res* 93:133-140

Dräger UC, Olsen JF (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191:383-412

Dräger UC, Olsen JF (1981) Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:285-293

Dräger UC, Hofbauer A (1984) Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina. *Nature* 309:624-626

Dreher Z, Robinson SR, Distler C (1992) Müller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *J Comp Neurol* 323:59-80

Drescher KM, Whittum-Hudson JA (1996a) Herpes simplex virus type 1 alters transcript levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2302-2312

Drescher KM, Whittum-Hudson JA (1996b) Modulation of immune-associated surface markers and cytokine production by murine retinal glial cells. *J Neuroimmunol* 64:71-81

Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA (1996) Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 114:299-305

Dreyer EB (1998) A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *J Glaucoma* 7:62-67

Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671

Dubois-Dauphin M, Poitry-Yamate C, de Bilbao F, Julliard AK, Jourdan F, Donati G (2000) Early postnatal Müller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* 95:9-21

Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, Katai M, Yan L, Suzuma K, West K, Davarya S, Tong P, Gehlbach P, Pearlman J, Crabb JW, Aiello LP, Campochiaro PA, Zack DJ (2002) Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:821-829

Dutrochet R (1824) *Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux, et sur leur motilité*. JB Baillière, Paris

E

Ebert S, Weigelt K, Walczak Y, Drobnik W, Mauerer R, Hume DA, Weber BHF, Langmann T (2009) Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *J Neurochem* 110:1863-1875

Ebneter A, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G (2010) Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:6448-6460

Eckmiller MS, Steinberg RH (1981) Localized depigmentation of the retinal pigment epithelium and macrophage invasion of the retina in the bullfrog. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21:369-394

Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Hollander H, Stone J (1996) Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Brain Res Dev Brain Res* 97:1-8

Eglitis MA, Mezey E (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4080-4085

Ehlers JP, Fekrat S (2011) Retinal vein occlusion: beyond the acute event. *Surv Ophthalmol* 56:281-299

Ehrenberg M, Thresher RJ, Machemer R (1984) Vitreous hemorrhage nontoxic to retina as a stimulator of glial and fibrous proliferation. *Am J Ophthalmol* 97:611-626

Eichler W, Yafai Y, Keller T, Wiedemann P, Reichenbach A (2004) PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 299:68-78

Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16:2508-2521

Emre M, Orgul S, Haufschild T, Shaw SG, Flammer J (2005) Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma. *Br J Ophthalmol* 89:60-63

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-1451

Erickson PA, Fisher SK, Guérin CJ, Anderson DH, Kaska DD (1987) Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. *Exp Eye Res* 44:37-48

Escartin C, Bonvento G (2008) Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. *Mol Neurobiol* 38:231-241

Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb H, Roth F, Maurer J, Holz FG, Kurts C (2008) In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3649-3658

Eyo UB, Dailey ME (2013) Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:494-509

F

Fan W, Li X, Wang W, Mo JS, Kaplan H, Cooper NG (2010) Early involvement of immune/inflammatory response genes in retinal degeneration in DBA/2J Mice. *Ophthalmol Eye Dis* 1:23-41

Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145

Felmy F, Pannicke T, Richt JA, Reichenbach A, Guenther E (2001) Electrophysiological properties of rat retinal Müller (glial) cells in postnatally developing and in pathologically altered retinae. *Glia* 34:190-199

Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF (2004) Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 137:62-69

Ferrer I, Bernet E, Soriano E, del Rio T, Fonseca M (1990) Naturally occurring cell death in the cerebral cortex of the rat and removal of dead cells by transitory phagocytes. *Neuroscience* 39:451-458

Filippopoulos T, Danias J, Chen B, Podos SM, Mittag TW (2006) Topographic and Morphologic Analyses of Retinal Ganglion Cell Loss in Old DBA/2NNia Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1968-1974

Fischer AJ, Reh TA (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4:247-252

Flammer J, Haefliger IO, Orgul S, Resink T (1999) Vascular dysregulation: a principal risk factor for glaucomatous damage? *J Glaucoma* 8:212-219

Flammer J, Orgul S, Costa VP, Orzalesi N, Kriegelstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefansson E (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 21:359-393

Flammer J, Mozaffarieh M (2007) What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Surv Ophthalmol* 52:S162-S173

Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT (2011) Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6:e15973

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154:4309-4321

Fortune B, Bui BV, Morrison JC, Johnson EC, Dong J, Cepurna WO, Jia L, Barber S, Cioffi GA (2004) Selective ganglion cell functional loss in rats with experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1854-1862

Franciosi S, Ryu JK, Shim Y, Hill A, Connolly C, Hayden MR, McLarnon JG, Leavitt BR (2012) Age-dependent neurovascular abnormalities and altered microglial morphology in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 45:438-449

Francke M, Makarov F, Kacza J, Seeger J, Wendt S, Gartner U, Faude F, Wiedemann P, Reichenbach A (2001) Retinal pigment epithelium melanin granules are phagocytosed by Müller glial cells in experimental retinal detachment. *J Neurocytol* 30:131-136

Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J (2007) Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8287-8292

Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z, Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:502-504

Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A (1989) On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* 19:689-694

Friedman PA, Zeidel ML (1999) Victory at C. *Nat Med* 5:620-621

Friedman WJ, Thakur S, Seidman L, Rabson AB (1996) Regulation of nerve growth factor mRNA by interleukin-1 in rat hippocampal astrocytes is mediated by NFkappaB. *J Biol Chem* 271:31115-31120

Fu CT, Sretavan D (2010) Laser-Induced Ocular Hypertension in Albino CD-1 Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:980-990

Fu QL, Zhang Y, Su YH, Sun YQ, Sun SJ, Shi JB (2011) Increasing expression of microglia in the retina after optic nerve transection in rats. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 47:1084-1088

G

Gaasterland D, Kupfer C (1974) Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Invest Ophthalmol* 13:455-457

Gabelt BT, Kaufman PL (2005) Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 24:612-637

Gadea A, Lopez E, Hernandez-Cruz A, Lopez-Colome AM (2002) Role of Ca²⁺ and calmodulin-dependent enzymes in the regulation of glycine transport in Müller glia. *J Neurochem* 80:634-645

Galindo-Romero C, Avilés-Trigueros M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás F, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011) Axotomy-induced retinal ganglion cell death in adult mice: Quantitative and topographic time course analyses. *Exp Eye Res* 92:377-387

Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2013) Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:974-985

Gallego A (1986) Comparative studies on horizontal cells and a note on microglial cells. *Prog Ret Res* 5:165-206

Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Garcia ES, Triviño A, Ramírez JM (2013) Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa. *Rev Esp Glaucoma Hipertensión Ocular* 3(2):197-211

Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221:7-14

Ganea E, Harding JJ (2006) Glutathione-related enzymes and the eye. *Curr Eye Res* 31:1-11

Ganter S, Northoff H, Mannel D, Gebicke-Harter PJ (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res* 33:218-230

Gao H, Hollyfield JG (1992) Basic fibroblast growth factor (bFGF) immunolocalization in the rodent outer retina demonstrated with an anti-rodent bFGF antibody. *Brain Res* 585:355-360

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241

Garcia M, Forster V, Hicks D, Vecino E (2003) In vivo expression of neurotrophins and neurotrophin receptors is conserved in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4532-4541

Garcia M, Vecino E (2003) Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol* 18:1205-1218

Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Coll-Alcaraz L, Canovas-Martinez I, Bernal-Garro JM, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Perez MP (2008) Characterization of the light-sensitive arciform region in the albino rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:E-abstract 4395

Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP (2010) Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res* 91:800-810

Garcia-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo-Barriuso M, Alarcon-Martinez L, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP (2011) Retinal ganglion cell axonal compression by retinal vessels in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 17:1716-1733

Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC (1995) Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61:33-44

Garcia-Valenzuela E, Sharma SC (1999) Laminar restriction of retinal macrophagic response to optic nerve axotomy in the rat. *J Neurobiol* 40:55-66

Garcia-Valenzuela E, Sharma SC, Piña AL (2005) Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol Vis* 11:225-231

Gass A, Flammer J, Linder L, Romerio SC, Gasser P, Haefeli WE (1997) Inverse correlation between endothelin-1-induced peripheral microvascular vasoconstriction and blood pressure in glaucoma patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:634-638

Gaucher DF, FAU CJ, Paques MF, Simonutti MF, Boitard C FAU - Sahel, Jose,A., FAU SJ, Massin PF, Picaud S (2007) Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. *Vision Res* 47(5):612-623

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: Intrinsic immuneeffector cell of the brain. *Brain Res Rev* 20:269-287

Germer A, Jahnke C, Mack A, Enzmann V, Reichenbach A (1997) Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Müller (glial) cells in retinal organ cultures. *Neuroreport* 8:3067-3072

Germer A, Biedermann B, Wolburg H, Schuck J, Grosche J, Kuhrt H, Reichelt W, Schousboe A, Paasche G, Mack AF, Reichenbach A (1998a) Distribution of mitochondria within Müller cells--I. Correlation with retinal vascularization in different mammalian species. *J Neurocytol* 27:329-345

Germer A, Schuck J, Wolburg H, Kuhrt H, Mack AF, Reichenbach A (1998b) Distribution of mitochondria within Müller cells--II. Post-natal development of the rabbit retinal periphery in vivo and in vitro: dependence on oxygen supply. *J Neurocytol* 27:347-359

Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G (1979) Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. *J Histochem Cytochem* 27:1634-1637

Gherghel D, Griffiths HR, Hilton EJ, Cunliffe IA, Hosking SL (2005) Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:877-883

Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324-1335

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845

Giulian D, Baker TJ (1985) Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. *J Cell Biol* 101:2411-2415

Giulian D, Baker TJ (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6:2163-2178

Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB (1986) Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 164:594-604

Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci* 8:4707-4717

Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8:2485-2490

Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C (1994a) Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem Int* 25:227-233

Giulian D, Li J, Li X, George J, Rutecki PA (1994b) The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS. *Dev Neurosci* 16:128-136

Glenn JA, Booth PL, Thomas WE (1991) Pinocytotic activity in ramified microglia. *Neurosci Lett* 123:27-31

Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K (1992) A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182:593-599

Golgi C (1873) Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana.Lombardia* 33:244-246

Golubnitschaja-Labudova O, Liu R, Decker C, Zhu P, Haefliger IO, Flammer J (2000) Altered gene expression in lymphocytes of patients with normal-tension glaucoma. *Curr Eye Res* 21:867-876

Golubnitschaja O, Yeghiazaryan K, Liu R, Monkemann H, Leppert D, Schild H, Haefliger IO, Flammer J (2004) Increased expression of matrix metalloproteinases in mononuclear blood cells of normal-tension glaucoma patients. *J Glaucoma* 13:66-72

Gomez-Ramirez AM, Villegas-Perez MP, Miralles de Imperial J, Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M (1999) Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:414-424

Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Garcia-Fernandez JM (2009) Daily rhythm of melanopsin-expressing cells in the mouse retina. *Front Cell Neurosci* 3:3

Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Garcia-Fernandez JM (2010a) No loss of melanopsin-expressing ganglion cells detected during postnatal development of the mouse retina. *Histol Histopathol* 25:73-82

Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Cernuda-Cernuda R, Provencio I, Garcia-Fernandez JM (2010b) Postnatal development and functional adaptations of the melanopsin photoreceptive system in the albino mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4840-4847

Gonzalez-Menendez I, Contreras F, Garcia-Fernandez JM, Cernuda-Cernuda R (2011) Perinatal development of melanopsin expression in the mouse retina. *Brain Res* 1419:12-18

Goodbrand IA, Gaze RM (1991) Microglia in tadpoles of *Xenopus laevis*: normal distribution and the response to optic nerve injury. *Anat Embryol (Berl)* 184:71-82

Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4:1165

Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 23:7093-7106

Gorczynski R, Chen Z, Kai Y, Lee L, Wong S, Marsden PA (2004) CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J Immunol* 172:7744-7749

Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 29:190-201

Gosselin D, Rivest S (2007) Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun* 21:281-289

Gottfried JA, Chesler M (1994) Endogenous H⁺ modulation of NMDA receptor-mediated EPSCs revealed by carbonic anhydrase inhibition in rat hippocampus. *J Physiol* 478 Pt 3:373-378

Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res* 21:18-24

Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW (1992) Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:303-311

Graeber MB (2010) Changing Face of Microglia. *Science* 330:783-788

Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:89-105

Gramlich OW, Beck S, und Hohenstein-Blaul, Nadine von Thun, Boehm N, Ziegler A, Vetter JM, Pfeiffer N, Grus FH (2013) Enhanced insight into the autoimmune component of glaucoma: IgG autoantibody accumulation and pro-inflammatory conditions in human glaucomatous retina. *PLoS One* 8:e57557

Grieshaber MC, Flammer J (2007) Does the Blood-brain Barrier Play a Role in Glaucoma? *Surv Ophthalmol* 52:S115-S121

Griffin WS (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr* 83:470S-474S

Gross RL, Ji J, Chang P, Pennesi ME, Yang Z, Zhang J, Wu SM (2003) A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 101:163

Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7:247-260

Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Allbaugh RA, Kwon YH, Kardon RH (2003a) Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4337-4346

Grozdanic SD, Betts DM, Sakaguchi DS, Kwon YH, Kardon RH, Sonea IM (2003b) Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Exp Eye Res* 77:27-33

Grozdanic SD, Kwon YH, Sakaguchi DS, Kardon RH, Sonea IM (2004) Functional evaluation of retina and optic nerve in the rat model of chronic ocular hypertension. *Exp Eye Res* 79:75-83

Grunwald JE, Piltz J, Hariprasad SM, Dupont J, Maguire MG (1999) Optic nerve blood flow in glaucoma: effect of systemic hypertension. *Am J Ophthalmol* 127:516-522

Grytz R, Meschke G, Jonas JB (2011) The collagen fibril architecture in the lamina cribrosa and peripapillary sclera predicted by a computational remodeling approach. *Biomech Model Mechanobiol* 10:371-382

Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75:388-397

Guillery RW (1986) Neurobiology. Routes for development. *Nature* 323:394-395

Guo L, Moss SE, Alexander RA, Ali RR, Fitzke FW, Cordeiro MF (2005) Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular pressure and IOP-induced effects on extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:175-182

Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76:463-471

H

Hainfellner JA, Voigtlander T, Strobel T, Mazal PR, Maddalena AS, Aguzzi A, Budka H (2001) Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:449-461

Hama K, Mizukawa A, Kosaka T (1978) Fine structure of the Müller cell revealed by high-voltage electron microscopy. *Sens Processes* 2:296-299

Hamilton SP, Rome LH (1994) Stimulation of in vitro myelin synthesis by microglia. *Glia* 11:326-335

Hammam T, Montgomery D, Morris D, Imrie F (2008) Prevalence of serum autoantibodies and paraproteins in patients with glaucoma. *Eye (Lond)* 22:349-353

Hammer M, Roggan A, Schweitzer D, Müller G (1995) Optical properties of ocular fundus tissues--an in vitro study using the double-integrating-sphere technique and inverse Monte Carlo simulation. *Phys Med Biol* 40:963-978

Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155

Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394

Hannibal J, Fahrenkrug J (2002) Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? *Ann Med* 34:401-407

Hannibal J, Fahrenkrug J, Holst JJ (2002) A newly discovered photopigment in the retina, melanopsin, directs the biological clocks of the brain. *Ugeskr Laeger* 164:2523

Hanninen VA, Pantcheva MB, Freeman EE, Poulin NR, Grosskreutz CL (2002) Activation of caspase 9 in a rat model of experimental glaucoma. *Curr Eye Res* 25:389-395

Hao C, Richardson A, Fedoroff S (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int J Dev Neurosci* 9:1-14

Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4663-4666

Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S, Matsuda H, Wada K (2000) Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 26:533-541

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 22:9228-9236

Harada T, Harada C (2004) Function of glial cell network as a modulator of neural cell death during retinal degeneration. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* 108:674-681

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295:1065-1070

Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau KW (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424:76-81

Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497:326-349

Hayes GM, Woodroffe MN, Cuzner ML (1987) Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J Neurol Sci* 80:25-37

Haynes WG, Hand MF, Johnstone HA, Padfield PL, Webb DJ (1994) Direct and sympathetically mediated venoconstriction in essential hypertension. Enhanced responses to endothelin-1. *J Clin Invest* 94:1359-1364

Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:d1356-68

Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184:69-91

Henle J, Friedrich M (1869) Ueber die sogenannte Blindesubstanz der Central-organe des Nervensystems. *Z Med* 34:49-82

Herber DL, Maloney JL, Roth LM, Freeman MJ, Morgan D, Gordon MN (2006) Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharide. *Glia* 53:382-391

Herman KG, Steinberg RH (1982) Phagosome degradation in the tapetal retinal pigment epithelium of the opossum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23:291-304

Hernandez MR, Pena JD (1997) The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 115:389-395

Hernandez MR (2000) The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res* 19:297-321

Herx LM, Rivest S, Yong VW (2000) Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *J Immunol* 165:2232-2239

Herx LM, Yong VW (2001) Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:961-971

Herzog KH, von Bartheld CS (1998) Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci* 18:2891-2906

Hickey WF (1999) Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11:125-137

Hildebrand C, Waxman SG (1983) Regional node-like membrane specializations in non-myelinated axons of rat retinal nerve fiber layer. *Brain Res* 258:23-32

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993) Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40:319-384

Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR (2013) Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb Cortex* 23:1784-1797

Hisatomi T, Sakamoto T, Sonoda KH, Tsutsumi C, Qiao H, Enaida H, Yamanaka I, Kubota T, Ishibashi T, Kura S, Susin SA, Kroemer G (2003) Clearance of apoptotic photoreceptors: elimination of apoptotic debris into the subretinal space and macrophage-mediated phagocytosis via phosphatidylserine receptor and integrin $\alpha v \beta 3$. *Am J Pathol* 162:1869-1879

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768-1771

Hofbauer A, Drager UC (1985) Depth segregation of retinal ganglion cells projecting to mouse superior colliculus. *J Comp Neurol* 234:465-474

Hoffman PN, Pollock SC, Strioph GG (1993) Altered gene expression after optic nerve transection: reduced neurofilament expression as a general response to axonal injury. *Exp Neurol* 119:32-36

Holcombe DJ, Lengefeld N, Gole GA, Barnett NL (2008) Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model. *Br J Ophthalmol* 92:683-688

Hollander H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL, Stone J (1991) Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J Comp Neurol* 313:587-603

Hollander H, Makarov F, Stefani FH, Stone J (1995) Evidence of constriction of optic nerve axons at the lamina cribrosa in the normotensive eye in humans and other mammals. *Ophthalmic Res* 27:296-309

Hollo G, Lakatos P, Farkas K (1998) Cold pressor test and plasma endothelin-1 concentration in primary open-angle and capsular glaucoma. *J Glaucoma* 7:105-110

Holopigian K, Seiple W, Mayron C, Koty R, Lorenzo M (1990) Electrophysiological and psychophysical flicker sensitivity in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1863-1868

Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, de Vos AF (2001) Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* 20:29-48

Honjo M, Tanihara H, Kido N, Inatani M, Okazaki K, Honda Y (2000) Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Müller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:552-560

Howell GR, Libby RT, John SW (2008) Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog Brain Res* 173:303-321

Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SW (2007) Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol* 179:1523-1537

Howell GR, Macalinao DG, Sousa GL, Walden M, Soto I, Kneeland SC, Barbay JM, King BL, Marchant JK, Hibbs M, Stevens B, Barres BA, Clark AF, Libby RT, John SW (2011) Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* 121:1429-1444

Howell GR, Soto I, Zhu X, Ryan M, Macalinao DG, Sousa GL, Caddle LB, MacNicol KH, Barbay JM, Porciatti V, Anderson MG, Smith RS, Clark AF, Libby RT, John SW (2012) Radiation treatment inhibits monocyte entry into the optic nerve head and prevents neuronal damage in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* 122:1246-1261

Hsu J, Lee Y, Chang C, Ling E, Lan C (2003) Sleep deprivation prior to transient global cerebral ischemia attenuates glial reaction in the rat hippocampal formation. *Brain Res* 984:170-181

Huang P, Qi Y, Xu YS, Liu J, Liao D, Zhang SS, Zhang C (2010) Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. *J Glaucoma* 19:324-330

Huang W, Fileta JB, Filippopoulos T, Ray A, Dobberfuhr A, Grosskreutz CL (2007) Hsp27 phosphorylation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4129-4135

Hughes EH, Schlichtenbrede FC, Murphy CC, Sarra G, Luthert PJ, Ali RR, Dick AD (2003) Generation of activated sialoadhesin-positive microglia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2229-2234

Hughes S, Welsh L, Katti C, Gonzalez-Menendez I, Turton M, Halford S, Sekaran S, Peirson SN, Hankins MW, Foster RG (2012) Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One* 7:e34531

Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983) Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol* 97:253-257

Humphrey MF, Moore SR (1995) Strain differences in the distribution of NDP-ase labelled microglia in the normal rabbit retina. *Glia* 15:367-376

Humphrey MF, Moore SR (1996) Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia* 16:325-341

Hurley SD, Coleman PD (2003) Facial nerve axotomy in aged and young adult rats: analysis of the glial response. *Neurobiol Aging* 24:511-518

Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40:195-205

Huster D, Reichenbach A, Reichelt W (2000) The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions. *Neurochem Int* 36:461-469

Hutchins KD, Dickson DW, Rashbaum WK, Lyman WD (1990) Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Brain Res Dev Brain Res* 55:95-102

I

Ibrahim MZ, Khreis Y, Koshayan DS (1974) The histochemical identification of microglia. *J Neurol Sci* 22:211-233

Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 261:108-112

Ikeda T, Puro DG (1994) Nerve growth factor: a mitogenic signal for retinal Müller glial cells. *Brain Res* 649:260-264

Ikui H, Uga S, Kohno T (1976) Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red. *Ophthalmic Res* 8:100-110

Ilia M, Jeffery G (1996) Delayed neurogenesis in the albino retina: evidence of a role for melanin in regulating the pace of cell generation. *Brain Res Dev Brain Res* 95:176-183

Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996) A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224:855-862

Imai Y, Kohsaka S (2002) Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia* 40:164-174

Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV (2003) The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci* 23:2824-2832

Inman DM, Horner PJ (2007) Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia* 55:942-953

Inman DM, Lupien CB, Horner PJ (2011) Manipulating glia to protect retinal ganglion cells in glaucoma. In: Gunvant P (ed) *Glaucoma-current clinical and research aspects*. InTech, pp 26-50

Inomata H (1975) Wound healing after xenon arc photocoagulation in the rabbit retina. Identification of the proliferating cells in the lesion by light and electron microscopic autoradiography using 3h-thymidine. *Ophthalmologica* 170:462-474

Irschick EU, Sgonc R, Bock G, Wolf H, Fuchs D, Nussbaumer W, Gottinger W, Huemer HP (2004) Retinal pigment epithelial phagocytosis and metabolism differ from those of macrophages. *Ophthalmic Res* 36:200-210

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57:1-9

Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y (2001) Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke* 32:1208-1215

J

Jakobs TC, Libby RT, Ben Y, John SW, Masland RH (2005) Retinal ganglion cell degeneration is topological but not cell type specific in DBA/2J mice. *J Cell Biol* 171:313-325

Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF (2008) Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol* 4:35-42

Jeffery G, Kinsella B (1992) Translaminar deficits in the retinae of albinos. *J Comp Neurol* 326:637-644

Jeffery G, Darling K, Whitmore A (1994) Melanin and the regulation of mammalian photoreceptor topography. *Eur J Neurosci* 6:657-667

Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936-8946

Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T (2007) Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia* 55:1334-1347

Joachim SC, Bruns K, Lackner KJ, Pfeiffer N, Grus FH (2007a) Antibodies to alpha B-crystallin, vimentin, and heat shock protein 70 in aqueous humor of patients with normal tension glaucoma and IgG antibody patterns against retinal antigen in aqueous humor. *Curr Eye Res* 32:501-509

Joachim SC, Wuenschig D, Pfeiffer N, Grus FH (2007b) IgG antibody patterns in aqueous humor of patients with primary open angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma. *Mol Vis* 13:1573-1579

Joachim SC, Reichelt J, Berneiser S, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246:573-580

Joachim SC, Reinehr S, Kuehn S, Laspas P, Gramlich OW, Kuehn M, Tischoff I, von Pein HD, Dick HB, Grus FH (2013) Immune response against ocular tissues after immunization with optic nerve antigens in a model of autoimmune glaucoma. *Mol Vis* 19:1804-1814

John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9:10-22

John GR, Lee SC, Song X, Riviaccio M, Brosnan CF (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49:161-176

John S, Smith RS, Savinova OV, Hawes NL, Chang B, Turnbull D, Davisson M, Roderick TH, Heckenlively JR (1998) Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:951-962

John SW, Hagaman JR, MacTaggart TE, Peng L, Smithes O (1997) Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:249-253

Johnson EC, Morrison JC, Farrell S, Deppmeier L, Moore CG, McGinty MR (1996) The effect of chronically elevated intraocular pressure on the rat optic nerve head extracellular matrix. *Exp Eye Res* 62:663-674

Johnson EC, Deppmeier LM, Wentzien SK, Hsu I, Morrison JC (2000) Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:431-442

Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC (2007) Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3161-3177

Johnson EC, Morrison JC (2009) Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma* 18:341-353

Johnson TV, Tomarev SI (2010) Rodent models of glaucoma. *Brain Res Bull* 81:349-358

Joly S, Pernet V, Chemtob S, Di Polo A, Lachapelle P (2007) Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2311-2320

Joly S, Francke M, Ulbricht E, Beck S, Seeliger M, Hirrlinger P, Hirrlinger J, Lang KS, Zinkernagel M, Odermatt B, Samardzija M, Reichenbach A, Grimm C, Reme CE (2009) Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol* 174:2310-2323

Jonakait GM, Luskin MB, Wei R, Tian XF, Ni L (1996) Conditioned medium from activated microglia promotes cholinergic differentiation in the basal forebrain in vitro. *Dev Biol* 177:85-95

Jones PS, Schechter N (1987) Distribution of specific intermediate-filament proteins in the goldfish retina. *J Comp Neurol* 266:112-121

Jordan FL, Thomas WE (1988) Brain macrophages: questions of origin and interrelationship. *Brain Res* 472:165-178

Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18:1450-1452

Ju KR, Kim HS, Kim JH, Lee NY, Park CK (2006) Retinal glial cell responses and Fas/FasL activation in rats with chronic ocular hypertension. *Brain Res* 1122:209-221

Jung C, Shea TB (1999) Regulation of neurofilament axonal transport by phosphorylation in optic axons in situ. *Cell Motil Cytoskeleton* 42:230-240

K

Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A (2005) Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 81:48-56

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2001) Neuronas y conducta. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Principios de neurociencia*. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, pp 19-35

Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H (2008) Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4162-4168

Kanski JJ (2004) Glaucoma. In: Kanski JJ (ed) *Oftalmología Clínica*. Elsevier, pp 195-276

Karageuzyan KG (2005) Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:85-98

Karlstetter M, Ebert S, Langmann T (2010) Microglia in the healthy and degenerating retina: Insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215:685-691

Kashii S, Takahashi M, Mandai M, Shimizu H, Honda Y, Sasa M, Ujihara H, Tamura Y, Yokota T, Akaike A (1994) Protective action of dopamine against glutamate neurotoxicity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:685-695

Kashiwagi K, Ou B, Nakamura S, Tanaka Y, Suzuki M, Tsukahara S (2003) Increase in dephosphorylation of the heavy neurofilament subunit in the monkey chronic glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:154-159

Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ (2000) Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3444-3450

Kelly S, Dunham JP, Donaldson LF (2007) Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *Eur J Neurosci* 26:935-942

Kepes JJ, Rubinstein LJ, Chiang H (1984) The role of astrocytes in the formation of cartilage in gliomas. An immunohistochemical study of four cases. *Am J Pathol* 117:471-483

Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME (1997) TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115:1031-1035

Kettenmann H, Verkhratsky A (2008) Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* 31:653-659

Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of Microglia. *Physiological Reviews* 91:461-553

Kezic J, McMenamin PG (2008) Differential turnover rates of monocyte-derived cells in varied ocular tissue microenvironments. *J Leukoc Biol* 84:721-729

Kezic JM, Chen X, Rakoczy EP, McMenamin PG (2013a) The effects of age and Cx3cr1 deficiency on retinal microglia in the Ins2(Akita) diabetic mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:854-863

Kezic JM, Chrysostomou V, Trounce IA, McMenamin PG, Crowston JG (2013b) Effect of anterior chamber cannulation and acute IOP elevation on retinal macrophages in the adult mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:3028-3036

Kiefer R, Gold R, Gehrmann J, Lindholm D, Wekerle H, Kreutzberg GW (1993) Transforming growth factor beta expression in reactive spinal cord microglia and meningeal inflammatory cells during experimental allergic neuritis. *J Neurosci Res* 36:391-398

Kielczewski JL, Pease ME, Quigley HA (2005) The effect of experimental glaucoma and optic nerve transection on amacrine cells in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3188-3196

Kipfer-Kauer A, McKinnon SJ, Frueh BE, Goldblum D (2010) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta in ocular hypertensive C57BL/6 mouse eyes. *Curr Eye Res* 35:828-834

Kitamura T (1973) The origin of brain macrophages--some considerations on the microglia theory of Del Rio-Hortega. *Acta Pathol Jpn* 23:11-26

Kitamura T, Miyake T, Fujita S (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 226:421-433

Klagsbrun M, D'Amore PA (1991) Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53:217-239

Kliot M, Shatz CJ (1985) Abnormal development of the retinogeniculate projection in Siamese cats. *J Neurosci* 5:2641-2653

Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res* 49:248-254

Knott AB, Bossy-Wetzel E (2009) Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 11:541-554

Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A (2002) Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39:292-303

Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-1056

Kokotas H, Kroupis C, Chiras D, Grigoriadou M, Lamnissou K, Petersen MB, Kitsos G (2012) Biomarkers in primary open angle glaucoma. *Clin Chem Lab Med* 50:2107-2119

Kolston J, Lisney SJ, Mulholland MN, Passant CD (1991) Transneuronal effects triggered by saphenous nerve injury on one side of a rat are restricted to neurones of the contralateral, homologous nerve. *Neurosci Lett* 130:187-189

Kommers T, Rodnight R, Oppelt D, Oliveira D, Wofchuk S (1999) The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor. *Neuroreport* 10:2119-2123

Kondo K, Hashimoto H, Kitanaka J, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T, Baba A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 188:140-142

Kong JH, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH (2005) Diversity of ganglion cells in the mouse retina: unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol* 489:293-310

Kong WC, Cho EY (1999) Antibodies against neurofilament subunits label retinal ganglion cells but not displaced amacrine cells of hamsters. *Life Sci* 64:1773-1778

Kontiola AI (2000) A new induction-based impact method for measuring intraocular pressure. *Acta Ophthalmol Scand* 78:142-145

Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, Danias J (2001) The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Exp Eye Res* 73:781-785

Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, Levison SW (2005) Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 54:1559-1565

Kremmer S, Kreuzfelder E, Klein R, Bontke N, Henneberg-Quester KB, Steuhl KP, Grosse-Wilde H (2001) Antiphosphatidylserine antibodies are elevated in normal tension glaucoma. *Clin Exp Immunol* 125:211-215

Kreutzberg GW, Barron KD (1978) 5'-Nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J Neurocytol* 7:601-610

Kreutzberg GW, Barron KD, Schubert P (1978) Cytochemical localization of 5'-nucleotidase in glial plasma membranes. *Brain Res* 158:247-257

Kreutzberg GW (1995) Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 45:357-360

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318

Krizaj D, Ryskamp DA, Tian N, Tezel G, Mitchell CH, Slepak VZ, Shestopalov VI (2014) From mechanosensitivity to inflammatory responses: new players in the pathology of glaucoma. *Curr Eye Res* 39:105-119

Kuehn MH, Kim CY, Ostojic J, Bellin M, Alward WL, Stone EM, Sakaguchi DS, Grozdanic SD, Kwon YH (2006) Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp Eye Res* 83:620-628

Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B (2001) Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res* 899:169-186

Kumar S, Zhuo L (2010) Longitudinal in vivo imaging of retinal gliosis in a diabetic mouse model. *Exp Eye Res* 91:530-536

Kumar A, Shamsuddin N (2012) Retinal Müller glia initiate innate response to infectious stimuli via toll-like receptor signaling. *PLoS One* 7:e29830

Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O, Steinberg D (2000) Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 67:104-108

L

Lafuente Lopez-Herrera MP, Mayor-Torroglosa S, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2002) Transient ischemia of the retina results in altered retrograde axoplasmic transport: neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 178:243-258

Lafuente MP, Villegas-Perez MP, Mayor-Torroglosa S, Aguilera ME, Miralles de Imperial J, Vidal-Sanz M (2002) Neuroprotective effects of brimonidine against transient ischemia-induced retinal ganglion cell death: a dose response in vivo study. *Exp Eye Res* 74:181-189

Lam TT, Kwong JMK, Tso MOM (2003) Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:638-645

Lang R, Lustig M, Francois F, Sellinger M, Plesken H (1994) Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling. *Development* 120:3395-3403

Langmann T (2007) Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81:1345-1351

Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF (1991) Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28:236-243

Lau J, Dang M, Hockmann K, Ball AK (2006) Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat. *Exp Eye Res* 82:132-145

Lawson LJ, Perry VH (1995) The unique characteristics of inflammatory responses in mouse brain are acquired during postnatal development. *Eur J Neurosci* 7:1584-1595

Lazarides E (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283:249-256

Lebrun-Julien F, Morquette B, Douillette A, Saragovi HU, Di Polo A (2009) Inhibition of p75(NTR) in glia potentiates TrkA-mediated survival of injured retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 40:410-420

Ledeboer A, Breve JJ, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, Tilders FJ, Van Dam AM (2002) Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci* 16:1175-1185

Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT (2008) Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4169-4176

Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187-217

Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW (2003) SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9:900-906

Lehmann U, Heuss ND, McPherson SW, Roehrich H, Gregerson DS (2010) Dendritic cells are early responders to retinal injury. *Neurobiol Dis* 40:177-184

Lehnardt S (2010) Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58:253-263

Leibinger M, Müller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D (2009) Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci* 29:14334-14341

Lenhossék M (1895) Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen: eine allgemeine Betrachtung der Strukturprinzipien des Nervensystems, nebst einer Darstellung des feineren Baues des Rückenmarkes. *Fischers Medicin Buchh.* H. Kornfeld, Berlin

Leonova J, Thorlin T, Aberg ND, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E (2001) Endothelin-1 decreases glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1495-503

Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E (2003) Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 121:48-56

Levkovitch-Verbin H, Martin KR, Quigley HA, Baumrind LA, Pease ME, Valenta D (2002a) Measurement of amino acid levels in the vitreous humor of rats after chronic intraocular pressure elevation or optic nerve transection. *J Glaucoma* 11:396-405

Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME (2002b) Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:402-410

Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK (1992) Basic fibroblast growth factor: a potential regulator of proliferation and intermediate filament expression in the retina. *J Neurosci* 12:3968-3978

Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK (1995) Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2404-2416

Lewis GP, Fisher SK (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230:263-290

Lewis GP, Sethi CS, Carter KM, Charteris DG, Fisher SK (2005) Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Mol Vis* 11:491-500

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146

Li Y, Schlamp CL, Nickells RW (1999) Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1004-1008

Libby RT, Anderson MG, Pang I, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, Snow A, Wilson LA, Smith RS, Clark AF (2005a) Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* 22:637

Libby RT, Li Y, Savinova OV, Barter J, Smith RS, Nickells RW, John SW (2005b) Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS genetics* 1:e4

Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6348-6352

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17:607-615

Lillo C, Velasco A, Jimeno D, Cid E, Aijon J, Lara JM (2001) Non-neuronal cells involved in the degeneration and regeneration of the fish retina. *J Neurocytol* 30:475-491

Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7526-7531

Ling E, Ng Y, Wu C, Kaur C (2001) Microglia: its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res* 132:61-79

Ling EA, Wong WC (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 7:9-18

Linser P, Moscona AA (1979) Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6476-6480

Linser PJ, Smith K, Angelides K (1985) A comparative analysis of glial and neuronal markers in the retina of fish: variable character of horizontal cells. *J Comp Neurol* 237:264-272

Lipton SA (1999) Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ* 6:943-951

Liu B, Neufeld AH (2000) Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 30:178-186

Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS (2001) Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *J Neurochem* 77:182-189

Liu G, Ma H, Jiang L, Zhao Y (2007) Allograft inflammatory factor-1 and its immune regulation. *Autoimmunity* 40:95-102

Liu S, Li Z, Weinreb RN, Xu G, Lindsey JD, Ye C, Yung W, Pang C, Lam DSC, Leung CK (2012) Tracking Retinal Microgliosis in Models of Retinal Ganglion Cell Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:6254-6262

Liu W, Wang CH, Cui Y, Mo LQ, Zhi JL, Sun SN, Wang YL, Yu HM, Zhao CM, Feng JQ, Chen PX (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase antagonizes morphine antinociceptive tolerance by decreasing activation of p38 MAPK in the spinal microglia. *Neurosci Lett* 410:174-177

Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A (1994) Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6:355-363

London A, Itskovich E, Benhar I, Kalchenko V, Mack M, Jung S, Schwartz M (2011) Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J Exp Med* 208:23-39

López Enríquez M (1926) Existencia de células de Hortega << microglía >> en la retina y vías ópticas. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural* 26:294-301

López Enríquez M (1927) Las células de Hortega de la retina y vías ópticas en estado normal y patológico. *Archivos de Oftalmología Hispano-Americanos* 27:322-349

López-Piñero JM (2006) Santiago Ramón y Cajal. Universitat de Valencia, Valencia

López-Sánchez JM (2012) Una escuela, dos laboratorios: Neurociencias en la Junta para Ampliación de Estudios. *Rev Asoc Esp Neuropsiq* 32:805-825

Lorber B, Guidi A, Fawcett JW, Martin KR (2012) Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma. *Neurobiol Dis* 45:243-252

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120:227-237

Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201

Lucas K, Karamichos D, Mathew R, Zieske JD, Stein-Streilein J (2012) Retinal Laser Burn-Induced Neuropathy Leads to Substance P-Dependent Loss of Ocular Immune Privilege. *J Immunol* 189:1237-1242

Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299:245-247

Ludviksson BR, Gunnlaugsdottir B (2003) Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol* 58:129-138

Lundmark PO, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP (2006) Role of melatonin in the eye and ocular dysfunctions. *Vis Neurosci* 23:853-862

Luo C, Yang X, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Tezel G (2010a) Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5697-5707

Luo J, Ho PP, Buckwalter MS, Hsu T, Lee LY, Zhang H, Kim DK, Kim SJ, Gambhir SS, Steinman L, Wyss-Coray T (2007) Glia-dependent TGF-beta signaling, acting independently of the TH17 pathway, is critical for initiation of murine autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 117:3306-3315

Luo X, Ding J, Chen S (2010b) Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurod* 5:12

M

Ma N, Streilein JW (1998) Contribution of microglia as passenger leukocytes to the fate of intraocular neuronal retinal grafts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2384-2393

Ma W, Zhao L, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT (2009) Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* 4:e7945

Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN (2004) Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4352-4358

MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, Snyder SH (1989) Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7285-7289

MacCumber MW, D'Anna SA (1994) Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* 112:1231-1235

Macharadze T, Goldschmidt J, Marunde M, Wanger T, Scheich H, Zuschratter W, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2009) Interretinal transduction of injury signals after unilateral optic nerve crush. *Neuroreport* 20:301-305

Maddox PH, Tay SK, Jenkins D (1987) A new fixed cryosection technique for the simultaneous immunocytochemical demonstration of T6 and S100 antigens. *Histochem J* 19:35-38

Madore C, Joffre C, Delpech JC, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Coste L, Laye S, Nadjar A (2013) Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 34:151-158

Magnus T, Chan A, Linker RA, Toyka KV, Gold R (2002) Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:760-766

Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E (1989) Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol* 36:106-112

Mano T, Puro DG (1990) Phagocytosis by human retinal glial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1047-1055

Marc RE, Murry RF, Fisher SK, Linberg KA, Lewis GP (1998) Amino acid signatures in the detached cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1694-1702

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Vazquez-Chona F, Vaughan DK, Organisciak DT (2008) Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 14:782-806

Marchesani O (1926) Die Morphologie der Glia in Nervous Opticus und in der Retina. *Graefe's Archiv F Ophthalm* 11(7):575-605

Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalban N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Perez MP (2006) Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J Comp Neurol* 498:163-179

Marella M, Chabry J (2004) Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24:620-627

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 322:1111-1122

Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J (1998) Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22:31-52

Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J (1999a) Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol (Berl)* 200:289-300

Marin-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A, Navascues J (1999b) Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* 27:226-238

Marin-Teva JL, Cuadros MA, Calvente R, Almendros A, Navascues J (1999c) Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J Comp Neurol* 412:255-275

Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547

Marmor MF (1999) Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* 97:239-249

Marmorstein AD (2001) The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2:867-872

Martínez A (2013) Papel de las alteraciones hemodinámicas sistémicas y oculares en el glaucoma. *Rev Esp Glau Hipert Ocul* 3:6-16

Martinez A, Sanchez M (2005) Predictive value of colour Doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol Scand* 83:716-722

Martinez-Murillo R, Martinez-Rodriguez R, Toledano A, Barca MA (1979) Histochemical characteristics of diphosphate nucleoside consumption in cat and rat nervous system. *Acta Histochem* 65:138-145

Maruyama I, Ohguro H, Ikeda Y (2000) Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1657-1665

Masuda T, Croom D, Hida H, Kirov SA (2011) Capillary blood flow around microglial somata determines dynamics of microglial processes in ischemic conditions. *Glia* 59:1744-1753

Mata M, Alessi D, Fink DJ (1990) S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. *J Neurocytol* 19:432-442

Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, Mitsuhashi U, Masuzawa T, Suzuki H, Honda M, Yazaki Y, Watanabe E, Luoma J, Yla-Herttuala S, Fraser I, Gordon S, Kodama T (1996) Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3269-3274

Matsui K, Hosoi N, Tachibana M (1999) Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci* 19:6755-6766

May CA, Lutjen-Drecoll E (2002) Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2206-2212

May CA (2003) The optic nerve head region of the aged rat: An immunohistochemical investigation. *Current Eye Research* 26:347

Mayor-Torroglosa S, De la Villa P, Rodriguez ME, Lopez-Herrera MP, Aviles-Trigueros M, Garcia-Aviles A, de Imperial JM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2005) Ischemia results 3 months later in altered ERG, degeneration of inner layers, and deafferented tectum: neuroprotection with brimonidine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3825-3835

Mazzoni IE, Kenigsberg RL (1997) Microglia from the developing rat medial septal area can affect cholinergic and GABAergic neuronal differentiation in vitro. *Neuroscience* 76:147-157

McCall MJ, Robinson SR, Dreher B (1987) Differential retinal growth appears to be the primary factor producing the ganglion cell density gradient in the rat. *Neurosci Lett* 79:78-84

McCord JM, Fridovich I (1978) The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 89:122-127

McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163

McKerracher L, Vallee RB, Aguayo AJ (1989) Microtubule-associated protein 1A (MAP 1A) is a ganglion cell marker in adult rat retina. *Vis Neurosci* 2:349-356

McKerracher L, Vidal-Sanz M, Essagian C, Aguayo AJ (1990) Selective impairment of slow axonal transport after optic nerve injury in adult rats. *J Neurosci* 10:2834-2841

McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ (2002) Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1077-1087

McKinnon SJ, Reitsamer HA, Ransom NL, Caldwell M, Harrison JM, Kiel JW (2003) Induction and tonopen measurement of ocular hypertension in C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:E-Abstract 3319

McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW (2009) Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma. *Exp Eye Res* 88:816-824

McKinnon SJ, Kasmala LT, Dixon AL (2010) Severe B- and T-lymphocyte immunodeficiency caused by Rag1 knockout prevents optic nerve axon loss in a mouse glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:E-Abstract 2523

McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD (2006) CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int* 49:195-203

McMenamin PG, Loeffler KU (1990) Cells resembling intraventricular macrophages are present in the subretinal space of human foetal eyes. *Anat Rec* 227:245-253

McMenamin PG, Holthouse I, Holt PG (1992) Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye: distribution, phenotype and relation to retinal microglia. *Immunology* 77:385-393

McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG (1994) Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3234-3250

McMenamin PG (1999a) Subretinal macrophages in the developing eye of eutherian mammals and marsupials. *Anat Embryol (Berl)* 200:551-558

McMenamin PG (1999b) Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye. *Br J Ophthalmol* 83:598-604

McMorris FA, Mozell RL, Carson MJ, Shinar Y, Meyer RD, Marchetti N (1993) Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 692:321-334

McTigue DM, Popovich PG, Morgan TE, Stokes BT (2000) Localization of transforming growth factor-beta1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 163:220-230

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 374:647-650

Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428-435

Mehaffey L, Holopigian K, Seiple W (1993) Electro-oculogram changes in patients with ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Doc Ophthalmol* 83:103-110

Menet V, Gimenez y Ribotta M, Chauvet N, Drian MJ, Lannoy J, Colucci-Guyon E, Privat A (2001) Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci* 21:6147-6158

Metz A, Spatz H (1924) Die Hortegaschen Zellen (= das sogenannte "dritte Element") und über ihre funktionelle Bedeutung. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 89:138-170

Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron* 15:805-819

Michelson G, Langhans MJ, Harazny J, Dichtl A (1998) Visual field defect and perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open-angle glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236:80-85

Middeldorp J, Hol EM (2011) GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93:421-443

Milligan CE, Levitt P, Cunningham TJ (1991) Brain macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol* 314:136-146

Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202:13-23

Minckler DS, Tso MO, Zimmerman LE (1976) A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema. *Am J Ophthalmol* 82:741-757

Minckler DS, Spaeth GL (1981) Optic nerve damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 26:128-148

Mittag TW, Danias J, Pohorenec G, Yuan H, Burakgazi E, Chalmers-Redman R, Podos SM, Tatton WG (2000) Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3451-3459

Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, Suzumura A (1994) Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1907-1915

Mohri I, Taniike M, Taniguchi H, Kanekiyo T, Aritake K, Inui T, Fukumoto N, Eguchi N, Kushi A, Sasai H, Kanaoka Y, Ozono K, Narumiya S, Suzuki K, Urade Y (2006) Prostaglandin D₂-mediated microglia/astrocyte interaction enhances astrogliosis and demyelination in twitcher. *J Neurosci* 26:4383-4393

Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012

Moore DJ, Hussain AA, Marshall J (1995) Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1290-1297

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765

Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146:1-14

Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sanz DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE (2004) Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med* 37:803-812

Moreno MC, Sande P, Marcos HA, de Zavalia N, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE (2005) Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB J* 19:1161-1162

Moretto G, Xu RY, Walker DG, Kim SU (1994) Co-expression of mRNA for neurotrophic factors in human neurons and glial cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:78-85

Morgan JE (2000) Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye* 14 (Pt 3B):437-444

Mori I, Imai Y, Kohsaka S, Kimura Y (2000) Upregulated expression of Iba1 molecules in the central nervous system of mice in response to neurovirulent influenza A virus infection. *Microbiol Immunol* 44:729-735

Morimoto T, Miyoshi T, Matsuda S, Tano Y, Fujikado T, Fukuda Y (2005) Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2147-2155

Morrison HW, Filosa JA (2013) A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflamm* 10:10-14

Morrison JC, Fraunfelder FW, Milne ST, Moore CG (1995) Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:751-756

Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64:85-96

Morrison JC (2005) Elevated intraocular pressure and optic nerve injury models in the rat. *J Glaucoma* 14:315-317

Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L (2005) Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res* 24:217-240

Morrison JC, Cepurna Ying Guo WO, Johnson EC (2011) Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: Insights from rodent models of glaucoma. *Exp Eye Res* 93:156-164

Motallebipour M, Rada-Iglesias A, Jansson M, Wadelius C (2005) The promoter of inducible nitric oxide synthase implicated in glaucoma based on genetic analysis and nuclear factor binding. *Mol Vis* 11:950-957

Mrak RE, Griffin WS (2004) Trisomy 21 and the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:679-685

Mrosovsky N, Hattar S (2003) Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int* 20:989-999

Müller A, Hauk TG, Fischer D (2007) Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain* 130:3308-3320

Müller M (1851) Zur Histologie der Netzhaut. *Z Wissenschaft Zool* 3:234-237

Müller M, Hollander H (1988) A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. An experimental study in the rat and the rabbit. *Exp Brain Res* 71:611-617

Munemasa Y, Kitaoka Y, Hayashi Y, Takeda H, Fujino H, Ohtani-Kaneko R, Hirata K, Ueno S (2008) Effects of unoprostone on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression in endothelin-1-induced retinal and optic nerve damage. *Vis Neurosci* 25:197-208

Munemasa Y, Kitaoka Y (2012) Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Front Cell Neurosci* 6:60

Murabe Y, Sano Y (1981) Thiaminepyrophosphatase activity in the plasma membrane of microglia. *Histochemistry* 71:45-52

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63:71-124

Murphy JA, Franklin TB, Rafuse VF, Clarke DB (2007) The neural cell adhesion molecule is necessary for normal adult retinal ganglion cell number and survival. *Mol Cell Neurosci* 36:280-292

Muther PS, Semkova I, Schmidt K, Abari E, Kuebbeler M, Beyer M, Abken H, Meyer KL, Kociok N, Jousen AM (2010) Conditions of retinal glial and inflammatory cell activation after irradiation in a GFP-chimeric mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4831-4839

N

Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3860-3868

Nagaraju M, Saleh M, Porciatti V (2007) IOP-dependent retinal ganglion cell dysfunction in glaucomatous DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4573-4579

Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S (1993) Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J Neurosci Res* 34:357-363

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26:47-54

Nakajima K, Shimojo M, Hamanoue M, Ishiura S, Sugita H, Kohsaka S (1992) Identification of elastase as a secretory protease from cultured rat microglia. *J Neurochem* 58:1401-1408

Nakajima K, Kohsaka S (2005) Response of microglia to brain injury. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, pp 443-453

Nakane PK, Pierce GBJ (1966) Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 14:929-931

Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI (2006) Tumor necrosis factor- α mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 26:12633-12641

Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, Cho KS, Jiao J, Wilhelmsson U, Fisher SK, Pekny M, Chen DF, Miller JW (2007) Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2760-2768

Napoli I, Neumann H (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158:1030-1038

Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB (2000) Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1940-1944

Naskar R, Wissing M, Thanos S (2002) Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2962-2968

Navascues J, Moujahid A, Quesada A, Cuadros MA (1994) Microglia in the avian retina: immunocytochemical demonstration in the adult quail. *J Comp Neurol* 350:171-186

Navascues J, Moujahid A, Almendros A, Marin-Teva JL, Cuadros MA (1995) Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol* 354:209-228

Neophytou C, Vernallis AB, Smith A, Raff MC (1997) Müller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development. *Development* 124:2345-2354

Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M (1997) Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 115:497-503

Neufeld AH, Das S, Vora S, Gachie E, Kawai S, Manning PT, Connor JR (2002) A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma. *J Glaucoma* 11:221-225

Neufeld AH (1999a) Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 117:1050-1056

Neufeld AH (1999b) Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1:S129-35

Neufeld AH, Sawada A, Becker B (1999) Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9944-9948

Neumann H (2001) Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36:191-199

Neumann H, Kotter M, Franklin R (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132:288-295

Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225:1174-1175

Newman EA (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* 317:809-811

Newman EA (1989) Potassium conductance block by barium in amphibian Müller cells. *Brain Res* 498:308-314

Newman EA (1996) Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. *J Neurosci* 16:159-168

- Newman EA, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312
- Newman EA, Zahs KR (1998) Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina. *J Neurosci* 18:4022-4028
- Newman EA (2003a) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542
- Newman EA (2003b) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23:1659-1666
- Newman EA (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47:268-274
- Newman EA (2005) Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci* 25:5502-5510
- Ng TF, Streilein JW (2001) Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3301-3310
- Nickells RW (1996) Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe. *J Glaucoma* 5:345-356
- Nieder Korn J, Streilein JW, Shadduck JA (1981) Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:355-363
- Nieder Korn JY, Streilein JW (1983) Alloantigens placed into the anterior chamber of the eye induce specific suppression of delayed-type hypersensitivity but normal cytotoxic T lymphocyte and helper T lymphocyte responses. *J Immunol* 131:2670-2674
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318
- Nishizono H, Murata Y, Tanaka M, Soji T, Herbert DC (1993) Evidence that Müller cells can phagocytize egg-lecithin-coated silicone particles. *Tissue Cell* 25:305-310
- Nixon RA, Lewis SE (1986) Differential turnover of phosphate groups on neurofilament subunits in mammalian neurons in vivo. *J Biol Chem* 261:16298-16301
- Nixon RA, Sihag RK (1991) Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14:501-506
- Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5:450-473
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, Nickells RW, Davis MD, Weber AJ, Vaegan, Sarks SH, Lemley HL, Millecchia LL (2000) Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol* 118:235-245

Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF (1992) Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17:877-885

Noske W, Hensen J, Wiederholt M (1997) Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:551-552

O

Oakley B2, Wen R (1989) Extracellular pH in the isolated retina of the toad in darkness and during illumination. *J Physiol* 419:353-378

O'Brien C, Butt Z (1999) Blood flow velocity in the peripheral circulation of glaucoma patients. *Ophthalmologica* 213:150-153

Oderfeld-Nowak B, Bacia A (1994) Expression of astroglial nerve growth factor in damaged brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54:73-80

Odoardi F, Kawakami N, Klinkert WE, Wekerle H, Flugel A (2007) Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18625-18630

Oh J, Recknor JB, Recknor JC, Mallapragada SK, Sakaguchi DS (2009) Soluble factors from neocortical astrocytes enhance neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult rat hippocampus on micropatterned polymer substrates. *J Biomed Mater Res A* 91:575-585

Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113 (Pt 17):3073-3084

Okuno T, Oku H, Sugiyama T, Goto W, Ikeda T (2003) Evaluation of nitric oxide synthesis in the optic nerve head in vivo using microdialysis and high-performance liquid chromatography and its interaction with endothelin-1. *Ophthalmic Res* 35:78-83

Olney JW (1969) Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 28:455-474

Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924

Ono K, Yokota S, Tsumori T, Kishi T, Yasui Y (1999) Development of macroglial cells in the embryonic chick optic nerve. *Brain Res Dev Brain Res* 118:211-215

Osborne NN (2008) Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Prog Brain Res* 173:339-352

Osborne NN (2010) Mitochondria: Their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma. *Exp Eye Res* 90:750-757

Otori Y, Shimada S, Tanaka K, Ishimoto I, Tano Y, Tohyama M (1994) Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 27:310-314

Owe SG, Marcaggi P, Attwell D (2006) The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *J Physiol* 577:591-599

Owens T (2009) Toll-like receptors in neurodegeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* 336:105-120

P

Palacios G (1990) A double immunocytochemical and histochemical technique for demonstration of cholinergic neurons and microglial cells in basal forebrain and neostriatum of the rat. *Neurosci Lett* 115:13-18

Panagis L, Thanos S, Fischer D, Dermon CR (2005) Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *Eur J Neurosci* 21:2305-2309

Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298:2213-2216

Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301:525-527

Pang IH, Clark AF (2007) Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma* 16:483-505

Pang JJ, Wu SM (2011) Morphology and immunoreactivity of retrogradely double-labeled ganglion cells in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:4886-4896

Pannese E (1999) The Golgi stain: invention, diffusion and impact on neurosciences. *J Hist Neurosci* 8:132-140

Pannicke T, Faude F, Reichenbach A, Reichelt W (2000) A function of delayed rectifier potassium channels in glial cells: maintenance of an auxiliary membrane potential under pathological conditions. *Brain Res* 862:187-193

Pannicke T, Bringmann A, Reichenbach A (2002) Electrophysiological characterization of retinal Müller glial cells from mouse during postnatal development: comparison with rabbit cells. *Glia* 38:268-272

Pant HC, Veeranna (1995) Neurofilament phosphorylation. *Biochem Cell Biol* 73:575-592

Parrilla-Reverter G, Agudo M, Nadal-Nicolas F, Alarcon-Martinez L, Jimenez-Lopez M, Salinas-Navarro M, Sobrado-Calvo P, Bernal-Garro JM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2009) Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: A comparative study. *Vision Res* 49:2808-2825

Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:764-774

Pease ME, Hammond JC, Quigley HA (2006) Manometric calibration and comparison of TonoLab and TonoPen tonometers in rats with experimental glaucoma and in normal mice. *J Glaucoma* 15:512-519

Pease ME, Cone FE, Gelman S, Son JL, Quigley HA (2011) Calibration of the TonoLab tonometer in mice with spontaneous or experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:858-864

Peinado-Ramon P, Salvador M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (1996) Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:489-500

Pekny M, Pekna M (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 204:428-437

Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434

Pena JD, Taylor AW, Ricard CS, Vidal I, Hernandez MR (1999) Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. *Br J Ophthalmol* 83:209-218

Penfold PL, Madigan MC, Provis JM (1991) Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7:383-388

Pennell NA, Streit WJ (1997) Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant* 6:221-230

Perez MT, Caminos E (1995) Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 183:96-99

Pérez-Alvarez A, Araque A (2013) Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr Drug Targets*

Perez-Alvarez MJ, Isiegas C, Santano C, Salazar JJ, Ramírez AI, Triviño A, Ramírez JM, Albar JP, de la Rosa EJ, Prada C (2008) Vimentin isoform expression in the human retina characterized with the monoclonal antibody 3CB2. *J Neurosci Res* 86:1871-1883

Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J (2008) Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38:27-65

Perry VH, Cowey A (1979) The effects of unilateral cortical and tectal lesions on retinal ganglion cells in rats. *Exp Brain Res* 35:85-95

Perry VH, Cowey A (1981) The morphological correlates of X- and Y-like retinal ganglion cells in the retina of monkeys. *Exp Brain Res* 43:226-228

- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15:313-326
- Perry VH, Gordon S (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11:273-277
- Perry VH, Gordon S (1991) Macrophages and the nervous system. *Int Rev Cytol* 125:203-244
- Perry VH, O'Connor V (2010) The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: a revised perspective. *ASN neuro* 14(2):e00047
- Persson M, Brantefjord M, Hansson E, Ronnback L (2005) Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia* 51:111-120
- Peters A, Palay S, Webster H (1991) The fine structure of the nervous system. Oxford University Press, New York
- Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007) The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics* 8:58-69
- Pfriegeer FW (2002) Role of glia in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 12:486-490
- Phillis JW (1994) A "radical" view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 42:441-448
- Pinazo-Duran MD, Zanon-Moreno V, Garcia-Medina JJ, Gallego-Pinazo R (2013) Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 13:98-107
- Pinilla I, Cuenca N, Salinas-Navarro M, Fernandez-Sanchez L, Alarcon-Martinez L, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez M, and M. Vidal-Sanz M (2008) Changes in the outer retina after acute increase of the intraocular pressure in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:E-abstract 5482
- Pixley SK, de Vellis J (1984) Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res* 317:201-209
- Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M (1995) Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15:5179-5191
- Polazzi E, Contestabile A (2002) Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Rev Neurosci* 13:221-242
- Polazzi E, Contestabile A (2006) Overactivation of LPS-stimulated microglial cells by co-cultured neurons or neuron-conditioned medium. *J Neuroimmunol* 172:104-111
- Polikov VS, Hong JS, Reichert WM (2010) Soluble factor effects on glial cell reactivity at the surface of gel-coated microwires. *J Neurosci Methods* 190:180-187

Polyak SL (1941) The retina: the anatomy and the histology of the retina in man, ape, and monkey, including the consideration of visual functions, the history of physiological optics, and the histological laboratory technique. Univ. Chicago Press., Chicago

Porchet R, Probst A, Bouras C, Draberova E, Draber P, Riederer BM (2003) Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics* 3:1476-1485

Pow DV, Perry VH, Morris JF, Gordon S (1989) Microglia in the neurohypophysis associate with and endocytose terminal portions of neurosecretory neurons. *Neuroscience* 33:567-578

Pow DV, Crook DK (1996) Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine. *Neuroscience* 70:295-302

Prasanna G, Krishnamoorthy R, Clark AF, Wordinger RJ, Yorio T (2002) Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2704-2713

Prasanna G, Hulet C, Desai D, Krishnamoorthy RR, Narayan S, Brun AM, Suburo AM, Yorio T (2005) Effect of elevated intraocular pressure on endothelin-1 in a rat model of glaucoma. *Pharmacol Res* 51:41-50

Prinz M, Mildner A (2011) Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59:177-187

Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 14:1227-1235

Provencio I, Cooper HM, Foster RG (1998a) Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol* 395:417-439

Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD (1998b) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:340-345

Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci* 20:600-605

Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415:493

Provis JM, Penfold PL, Edwards AJ, van Driel D (1995) Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia* 14:243-256

Puro DG, Roberge F, Chan CC (1989) Retinal glial cell proliferation and ion channels: a possible link. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30:521-529

Puro DG, Mano T (1991) Modulation of calcium channels in human retinal glial cells by basic fibroblast growth factor: a possible role in retinal pathobiology. *J Neurosci* 11:1873-1880

Q

Qian H, Malchow RP, Ripps H (1993) The effects of lowered extracellular sodium on gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of Müller (glial) cells of the skate retina. *Cell Mol Neurobiol* 13:147-158

Qiao H, Lucas K, Stein-Streilein J (2009) Retinal laser burn disrupts immune privilege in the eye. *The American journal of pathology* 174:414-422

Quigley HA, Anderson DR (1977) Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:640-644

Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE (1981) Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99:635-649

Quigley HA, Hohman RM (1983) Laser energy levels for trabecular meshwork damage in the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1305-1307

Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR (1989) Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107:453-464

Quigley HA (1999) Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 18:39-57

Quigley HA, Broman AT (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Brit J Ophthalmol* 90:262-267

Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25:11595-11604

Quitschke W, Sibony P, Schechter N (1985) Variable expression of intermediate filament proteins during embryonic development of human optic nerve. *Exp Neurol* 90:204-214

R

Rabchevsky AG, Weinitz JM, Culpier M, Fages C, Tinel M, Junier MP (1998) A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J Neurosci* 18:10541-10552

Rader J, Feuer WJ, Anderson DR (1994) Peripapillary vasoconstriction in the glaucomas and the anterior ischemic optic neuropathies. *Am J Ophthalmol* 117:72-80

Raivich G, Bluethmann H, Kreutzberg GW (1996) Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med* 45:239-247

Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105

Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1994) Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res* 34:1935-1946

Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1996) Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res* 36:2029-2036

Ramírez A, Salazar J, Ramírez J, Triviño A (1998a) Morfología y distribución de la astroglía retiniana en la rata albina. *Arch Soc Esp Oftalmol* 73:533-538

Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ (1998b) Organization and function of astrocytes in human retina. In: Castellano B, Gonzalez B, Nieto-Sampedro M (eds) *Understanding glial cells*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 47--62

Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A (2001) Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 73:601-615

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Trivino A, Ramírez JM (2010) Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5690-5696

Ramirez-Exposito MJ, Martinez-Martos JM (1998) Structure and functions of the macroglia in the central nervous system. Response to degenerative disorders. *Rev Neurol* 26:600-611

Ramón y Cajal S (1892) La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9:121-225

Ramón y Cajal S (1899) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid

Ramón y Cajal S (1904) Das Neurofibrillennetz der Retina. *Intern Monatschr Anat Physiol* 21:4-8

Ramón y Cajal S (1909) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Maloine, París

Ramón y Cajal S (1913a) Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XI*:219-237

Ramón y Cajal S (1913b) Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XI*:255-315

Ramón y Cajal S (1916) El proceder del oro-sublimado para la coloración de la neuroglia. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XIV*:155-162

Ramón y Cajal S (1920) Algunas consideraciones sobre la mesoglía de Robertson y Río-Hortega. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas XVIII (2-3)*:109-127

Ramón y Cajal S (1923) *Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica*. Alianza Universidad

Rao NA, Thaete LG, Delmage JM, Sevanian A (1985) Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:1778-1781

Rao NA, Kimoto T, Zamir E, Giri R, Wang R, Ito S, Pararajasegaram G, Read RW, Wu GS (2003) Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:22-31

Rao VR, Krishnamoorthy RR, Yorio T (2008) Endothelin-1 mediated regulation of extracellular matrix collagens in cells of human lamina cribrosa. *Exp Eye Res* 86:886-894

Raoul W, Keller N, Rodéro M, Behar-Cohen F, Sennlaub F, Combadière C (2008) Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells. *J Neuroimmunol* 198:56-61

Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M (1998) High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 291:19-31

RDL 53/2013 (de 8 de febrero) Real Decreto 53/2013 . Boletín Oficial del Estado 2013. 34:11370-11421

Recknor JB, Sakaguchi DS, Mallapragada SK (2006) Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates. *Biomaterials* 27:4098-4108

Reichelt J, Joachim SC, Pfeiffer N, Grus FH (2008) Analysis of autoantibodies against human retinal antigens in sera of patients with glaucoma and ocular hypertension. *Curr Eye Res* 33:253-261

Reichelt W, Dettmer D, Bruckner G, Brust P, Eberhardt W, Reichenbach A (1989) Potassium as a signal for both proliferation and differentiation of rabbit retinal (Müller) glia growing in cell culture. *Cell Signal* 1:187-194

Reichenbach A, Reichelt W (1986) Postnatal development of radial glial (Müller) cells of the rabbit retina. *Neurosci Lett* 71:125-130

Reichenbach A, Wohlrab F (1986) Morphometric parameters of Müller (glial) cells dependent on their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J Neurocytol* 15:451-459

Reichenbach A, Hagen E, Schippel K, Eberhardt W (1988a) Quantitative electron microscopy of rabbit Müller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Z Mikrosk Anat Forsch* 102:721-755

Reichenbach A, Schippel K, Schumann R, Hagen E (1988b) Ultrastructure of rabbit retinal nerve fibre layer--neuro-glial relationships, myelination, and nerve fibre spectrum. *J Hirnforsch* 29:481-491

Reichenbach A (1989) Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Müller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia* 2:250-259

Reichenbach A, Schneider H, Leibnitz L, Reichelt W, Schaaf P, Schumann R (1989) The structure of rabbit retinal Müller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl)* 180:71-79

Reichenbach A, Henke A, Eberhardt W, Reichelt W, Dettmer D (1992) K⁺ ion regulation in retina. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S239-47

Reichenbach A, Bringmann A (2010a) Müller cells in the healthy retina. In: Reichenbach A, Bringmann A (eds) Müller cells in the healthy and diseased retina. Springer, New York, pp 35-214

Reichenbach A, Bringmann A (2010b) Müller cells in the diseased retina. In: Reichenbach A, Bringmann A (eds) Müller cells in the healthy and diseased retina. Springer, New York, pp 215-299

Reichstein D, Ren L, Filippopoulos T, Mittag T, Danias J (2007) Apoptotic retinal ganglion cell death in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 84:13-21

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z (2003) Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 50:1129-1146

Richardson A, Hao C, Fedoroff S (1993) Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7:25-33

Richardson PM (1994) Ciliary neurotrophic factor: a review. *Pharmacol Ther* 63:187-198

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577

Rieck J (2013) The Pathogenesis of Glaucoma in the Interplay with the Immune System. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:2393-2409

Riera JB, del Río-Hortega J (2004) Pío del Río Hortega y la institucionalización de la ciencia en España. In: Escribano J, Martínez MA (eds) Historia de las ciencias y de las técnicas (Actas VIII Congreso), 1. Universidad de La Rioja, pp 161-200

Rieske E, Graeber MB, Tetzlaff W, Czlankowska A, Streit WJ, Kreutzberg GW (1989) Microglia and microglia-derived brain macrophages in culture: generation from axotomized rat facial nuclei, identification and characterization in vitro. *Brain Res* 492:1-14

Rigosi E, Ensini M, Bottari D, Leone P, Galli-Resta L (2010) Loss of retinal capillary vasoconstrictor response to Endothelin-1 following pressure increments in living isolated rat retinas. *Exp Eye Res* 90:33-40

Rimaniol AC, Haik S, Martin M, Le Grand R, Boussin FD, Dereuddre-Bosquet N, Gras G, Dormont D (2000) Na⁺-dependent high-affinity glutamate transport in macrophages. *J Immunol* 164:5430-5438

Riol H, Tardy M, Rolland B, Levesque G, Murthy MR (1997) Detection of the peripheral nervous system (PNS)-type glial fibrillary acidic protein (GFAP) and its mRNA in human lymphocytes. *J Neurosci Res* 48:53-62

Ripodas A, de Juan JA, Roldan-Pallares M, Bernal R, Moya J, Chao M, Lopez A, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango R (2001) Localisation of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocytes. *Brain Res* 912:137-143

Riva MA, Mocchetti I (1991) Developmental expression of the basic fibroblast growth factor gene in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 62:45-50

Rollag MD, Berson DM, Provencio I (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms* 18:227-234

Romano C, Barrett DA, Li Z, Pestronk A, Wax MB (1995) Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1968-1975

Roque RS, Caldwell RB, Behzadian MA (1992) Cultured Müller cells have high levels of epidermal growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:2587-2595

Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB (1996) Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:196-203

Rosenthal AR, Appleton B (1975) Histochemical localization of intraocular copper foreign bodies. *Am J Ophthalmol* 79:613-625

Rossetti L, Marchetti I, Orzalesi N, Scorpiglione N, Torri V, Liberati A (1993) Randomized clinical trials on medical treatment of glaucoma. Are they appropriate to guide clinical practice? *Arch Ophthalmol* 111:96-103

S

Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, O'Hara BF (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298:2211-2213

Rudge JS, Silver J (1990) Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* 10:3594-3603

Ruiz-Ederra J, Verkman A (2006) Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Exp Eye Res* 82:879-884

Saeki T, Aihara M, Ohashi M, Araie M (2008) The efficacy of TonoLab in detecting physiological and pharmacological changes of mouse intraocular pressure--comparison with TonoPen and microneedle manometry. *Curr Eye Res* 33:247-252

Sahel JA, Albert DM, Lessell S (1990) Proliferation of retinal glia and excitatory amino acids. *Ophtalmologie* 4:13-16

Sahel JA, Albert DM, Lessell S, Adler H, McGee TL, Konrad-Rastegar J (1991) Mitogenic effects of excitatory amino acids in the adult rat retina. *Exp Eye Res* 53:657-664

Saleh M, Nagaraju M, Porciatti V (2007) Longitudinal evaluation of retinal ganglion cell function and IOP in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4564-4572

Salinas-Navarro M, Trivino A, Ramirez AI, Salazar JJ, Ramirez JM, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2006) Long Term Effects of Laser-Induced Ocular Hypertension: Retrograde Degeneration of Retinal Ganglion Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:E-Abstract 1560

Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcon-Martinez L, Cánovas I, Bernal J, Soro MI, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2007) Laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins induced elevation of the intraocular pressure. Effects of the retinal ganglion cell population of the albino mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:E-Abstract 4353

Salinas-Navarro M, Napankangas U, Turunen N, Veijola J, Valiente-Soriano F, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2008) Effects of acute increase of intraocular pressure in adult pigmented rats: assessment of the retinal nerve fiber layer (in vivo) and the retinal ganglion cell population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:E-Abstract 5480

Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Ortin-Martinez A, Jimenez-Lopez M, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M (2009a) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis* 15:2578-2598

Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, Alarcón-Martínez L, Avilés-Trigueros M, Mayor S, Holmes T, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2009b) Retinal ganglion cell population in adult albino and pigmented mice: A computerized analysis of the entire population and its spatial distribution. *Vision Res* 49:637-647

Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jimenez-Lopez M, Aviles-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2009c) A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 49:115-126

Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Jimenez-Lopez M, Mayor-Torroglosa S, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 90:168-183

Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP (2000) Microglial cells in the retina of *Carassius auratus*: effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417:431-447

Samsel PA, Kisiswa L, Erichsen JT, Cross SD, Morgan JE (2011) A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1671-1675

Sanchez-Migallon MC, Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2011) Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 92:260-267

Santello M, Calì C, Bezzi P (2012) Gliotransmission and the Tripartite Synapse. In: Kreutz M, Sala C (eds) *Synaptic Plasticity Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp 285-305

Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martín-Oliva D, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506:224-239

Santos AM, Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM, Tassi M, Calvente R, Sierra A, Carrasco MC, Marín-Teva JL, Navascués J, Cuadros MA (2010) Microglial response to light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *J Comp Neurol* 518:477-492

Sanyal S, De Ruiter A, Dees C (1984) Light dependent accumulation of macrophages at the photoreceptor-pigment epithelial interface in the retina of albino mice. *Experientia* 40:852-854

Sappington RM, Calkins DJ (2008) Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFκB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3004-3017

Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The Microbead Occlusion Model: A Paradigm for Induced Ocular Hypertension in Rats and Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:207-216

Sarthy PV, Lam DM (1978) Biochemical studies of isolated glial (Müller) cells from the turtle retina. *J Cell Biol* 78:675-684

Sarthy PV (1982) The uptake of [3H]gamma-aminobutyric acid by isolated glial (Müller) cells from the mouse retina. *J Neurosci Methods* 5:77-82

Sarthy V, Ripps H (2001a) Structural organization of retinal glia. In: Sarthy V, Ripps H (eds) *The Retinal Müller Cell. Structure and function*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 1-34

Sarthy V, Ripps H (2001b) K⁺ dynamics, ion channels, and transretinal potentials. In: Sarthy V, Ripps H (eds) *The retinal Müller cell. Structure and function*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 135-180

Sarthy V, Ripps H (2001c) Role in retinal pathophysiology. In: Sarthy V, Ripps H (eds) *The Retinal Müller Cell. Structure and function*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 181-215

Sarthy VP, Pignataro L, Pannicke T, Weick M, Reichenbach A, Harada T, Tanaka K, Marc R (2005) Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* 49:184-196

Sasahara M, Otani A, Oishi A, Kojima H, Yodoi Y, Kameda T, Nakamura H, Yoshimura N (2008) Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. *Am J Pathol* 172:1693-1703

Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y (2001) Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 286:292-297

Sassoe Pognetto M, Panzanelli P, Artero C, Fasolo A, Cantino D (1992) Comparative study of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the retina of some representative vertebrates. *Eur J Histochem* 36:467-477

Satilmis M, Orgul S, Doubler B, Flammer J (2003) Rate of progression of glaucoma correlates with retrobulbar circulation and intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* 135:664-669

Sato Y, Rifkin DB (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109:309-315

Sattler R, Rothstein JD (2006) Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol* (175):277-303

Savinova OV, Sugiyama F, Martin JE, Tomarev SI, Paigen BJ, Smith RS, John SW (2001) Intraocular pressure in genetically distinct mice: an update and strain survey. *BMC Genet* 2:12

Sawada A, Neufeld AH (1999) Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res* 69:525-531

Schallner N, Fuchs M, Schwer CI, Loop T, Buerkle H, Lagreze WA, van Oterendorp C, Biermann J, Goebel U (2012) Postconditioning with inhaled carbon monoxide counteracts apoptosis and neuroinflammation in the ischemic rat retina. *PLoS One* 7:e46479

Scherer J, Schnitzer J (1994) Growth factor effects on the proliferation of different retinal glial cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 80:209-221

Schilling T, Nitsch R, Heinemann U, Haas D, Eder C (2001) Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur J Neurosci* 14:463-473

Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC, Nickells RW (2001) Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis* 7:192-201

Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW (2006) Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci* 7:66

Schleich CL (1899) *Schmerzlose Operationen*. Julius Springer

Schmidt SL, Vitral RW, Linden R (2001) Effects of prenatal ionizing irradiation on the development of the ganglion cell layer of the mouse retina. *Int J Dev Neurosci* 19:469-473

Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377:147-154

Schnitzer J (1988) Immunocytochemical studies on the development of astrocytes, Müller (glial) cells, and oligodendrocytes in the rabbit retina. *Brain Res Dev Brain Res* 44:59-72

Schnitzer J (1989) Enzyme-histochemical demonstration of microglial cells in the adult and postnatal rabbit retina. *J Comp Neurol* 282:249-263

Schnitzer J, Scherer J (1990) Microglial cell responses in the rabbit retina following transection of the optic nerve. *J Comp Neurol* 302:779-791

Schuetz E, Thanos S (2004) Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 5:619-627

Schultze M (1859) *Observationes de retinae structura penitiori*. Published lecture at the University of Bonn

Schutte M, Werner P (1998) Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett* 246:53-56

Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206

Seki M, Tanaka T, Sakai Y, Fukuchi T, Abe H, Nawa H, Takei N (2005) Müller cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Müller cells. *Neurochem Res* 30:1163-1170

Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gomez JM, Vidal-Sanz M (1996) Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2002-2014

Selmaj K, Shafit-Zagardo B, Aquino DA, Farooq M, Raine CS, Norton WT, Brosnan CF (1991) Tumor necrosis factor-induced proliferation of astrocytes from mature brain is associated with down-regulation of glial fibrillary acidic protein mRNA. *J Neurochem* 57:823-830

Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG (2003) Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci* 17:1793-1801

Semple-Rowland SL (1991) Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J Comp Neurol* 305:582-590

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160

Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC (1995) Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res* 61:379-382

Shen W, Slaughter MM (2002) A non-excitatory paradigm of glutamate toxicity. *J Neurophysiol* 87:1629-1634

Siesjo BK (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:155-185

Siesky BA, Harris A, Amireskandari A, Marek B (2012) Glaucoma and ocular blood flow: an anatomical perspective. *Ex Rev Op* 7:325-340

Sievers J, Struckhoff G, Puchner M (1993) Interleukin-1 beta does not induce reactive astrogliosis, neovascularization or scar formation in the immature rat brain. *Int J Dev Neurosci* 11:281-293

Sigal IA, Flanagan JG, Tertinegg I, Ethier CR (2010) 3D morphometry of the human optic nerve head. *Exp Eye Res* 90:70-80

Siliprandi R, Lipartiti M, Fadda E, Sautter J, Manev H (1992) Activation of the glutamate metabotropic receptor protects retina against N-methyl-D-aspartate toxicity. *Eur J Pharmacol* 219:173-174

Silveira L, Yamada E, Picanço-Diniz C (1989) Displaced horizontal cells and biphaxiform horizontal cells in the mammalian retina. *Vis Neurosci* 3:483-488

Silveira LC, Russelakis-Carneiro M, Perry VH (1994) The ganglion cell response to optic nerve injury in the cat: differential responses revealed by neurofibrillar staining. *J Neurocytol* 23:75-86

Silver IA, Deas J, Erecinska M (1997) Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience* 78:589-601

Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896

Sjostrand J (1966) Changes of nucleoside phosphatase activity in the hypoglossal nucleus during nerve regeneration. *Acta Physiol Scand* 67:219-228

Skatchkov SN, Eaton MJ, Krusek J, Veh RW, Biedermann B, Bringmann A, Pannicke T, Orkand RK, Reichenbach A (2000) Spatial distribution of spermine/spermidine content and K(+)-current rectification in frog retinal glial (Müller) cells. *Glia* 31:84-90

Skatchkov SN, Eaton MJ, Shuba YM, Kucheryavykh YV, Derst C, Veh RW, Wurm A, Iandiev I, Pannicke T, Bringmann A, Reichenbach A (2006) Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Müller) glial cells. *Glia* 53:266-276

Small RK, Patel P, Watkins BA (1991) Response of Müller cells to growth factors alters with time in culture. *Glia* 4:469-483

Smith GM, Hale JH (1997) Macrophage/Microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 17:9624-9633

Snodderly DM (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62:1448S-1461S

Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP (2007) Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol* 501:866-878

Sociedad Europea de Glaucoma (2008) Terminología y pautas para el glaucoma (3ª ed). Dogma, Savona, Italia

Sofroniew M, Vinters H (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35

Son JL, Soto I, Oglesby E, Lopez-Roca T, Pease ME, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2010) Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss. *Glia* 58:780-789

Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44

Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N (2008) Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci* 28:548-561

Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N (2011) Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:434-441

Spalding KL, Rush RA, Harvey AR (2004) Target-derived and locally derived neurotrophins support retinal ganglion cell survival in the neonatal rat retina. *J Neurobiol* 60:319-327

Stasi K, Nagel D, Yang X, Wang RF, Ren L, Podos SM, Mittag T, Danias J (2006) Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1024-1029

Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML (2006) Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:977-985

Stein-Streilein J (May 06, 2012) Local and distant trauma upsets ocular immune regulation. Symposium. In: The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (ed) ARVO: anual meeting, Fort Lauderdale, Miami.

Stence N, Waite M, Dailey ME (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266

Sternberger LA, Hardy PH, Jr, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333

Sternberger NH, Sternberger LA, Ulrich J (1985) Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4274-4276

Stevens ER, Esguerra M, Kim PM, Newman EA, Snyder SH, Zahs KR, Miller RF (2003) D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6789-6794

Stier H, Schlosshauer B (1998) Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth. *Eur J Neurosci* 10:1000-1010

Stokely ME, Brady ST, Yorio T (2002) Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3223-3230

Stolzenburg JU, Haas J, Hartig W, Paulke BR, Wolburg H, Reichelt W, Chao TI, Wolff JR, Reichenbach A (1992) Phagocytosis of latex beads by rabbit retinal Müller (glial) cells in vitro. *J Hirnforsch* 33:557-564

Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255:35-49

Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK, Bisti S, Gargini C, Cervetto L, Merin S, Peer J (1999) Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 18:689-735

Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Fong Ng T, Zamiri P (2002) Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 42:487-495

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1:301-307

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1989) Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21:117-123

Streit WJ (1990) An improved staining method for rat microglial cells using the lectin from *Griffonia simplicifolia* (GSA I-B4). *J Histochem Cytochem* 38:1683-1686

Streit WJ, Sparks DL (1997) Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *J Mol Med* 75:130-138

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Progr Neurobiol* 57:563-581

Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL (2000) Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res* 61:10-20

Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133-139

Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL (2004) Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia* 45:208-212

Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL (2005) Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* 27:685-691

Streit WJ (2013) Microglial cells. In: Kettenmann H, Ranson BR (eds) *Neuroglia*. Oxford University Press, pp 930-86-97

Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW (2001) Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol* 21:427-449

Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB (1997) Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 37:3483-3493

Sugama S, Fujita M, Hashimoto M, Conti B (2007) Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146:1388-1399

Sugita S (2009) Role of ocular pigment epithelial cells in immune privilege. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 57:263-268

Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA (2007) Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)pro pyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* 321:45-50

Sullivan R, Penfold P, Pow DV (2003) Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:856-865

Sullivan RK, Woldemussie E, Macnab L, Ruiz G, Pow DV (2006) Evoked expression of the glutamate transporter GLT-1c in retinal ganglion cells in human glaucoma and in a rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3853-3859

Sun W, Li N, He S (2002) Large-scale morphological survey of mouse retinal ganglion cells. *J Comp Neurol* 451(2):115-126

Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A (2008) Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis* 14:1540-1548

Suzumura A, Meztis SG, Gonatas NK, Silberberg DH (1987) MHC antigen expression on bulk isolated macrophage-microglia from newborn mouse brain: induction of Ia antigen expression by gamma-interferon. *J Neuroimmunol* 15:263-278

Svendsen CN (2002) The amazing astrocyte. *Nature* 417:29-32

Svensson M, Aldskogius H (1993) Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp Neurol* 120:123-131

T

Taira T, Smirnov S, Voipio J, Kaila K (1993) Intrinsic proton modulation of excitatory transmission in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 4:93-96

Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol* 85:352-370

Tamm ER, Russell P, Johnson DH, Piatigorsky J (1996) Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2402-2413

Tanaka J, Toku K, Sakanaka M, Maeda N (1999) Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes. *Neurosci Res* 34:207-215

Tanihara H, Hangai M, Sawaguchi S, Abe H, Kageyama M, Nakazawa F, Shirasawa E, Honda Y (1997) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115:752-756

Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS (2003) Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Brain Res Mol Brain Res* 111:189-197

Terenghi G, Cocchia D, Michetti F, Diani AR, Peterson T, Cole DF, Bloom SR, Polak JM (1983) Localization of S-100 protein in Müller cells of the retina--1. Light microscopical immunocytochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:976-980

Terubayashi H, Murabe Y, Fujisawa H, Itoi M, Iyata Y (1984) Enzymehistochemical identification of microglial cells in the rat retina: light and electron microscopic studies. *Exp Eye Res* 39:595-603

Tezel G, Kass MA, Kolker AE, Becker B, Wax MB (1997) Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 6:83-89

Tezel G, Seigel G, Wax M (1998) Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2277-2287

Tezel G, Edward DP, Wax MB (1999a) Serum autoantibodies to optic nerve head glycosaminoglycans in patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 117:917-924

Tezel GM, Seigel GM, Wax MB (1999b) Density-dependent resistance to apoptosis in retinal cells. *Curr Eye Res* 19:377-388

Tezel G, Wax MB (2000a) Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci* 20:8693-8700

Tezel G, Wax MB (2000b) The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J Neurosci* 20:3552-3562

Tezel G, Li LY, Patil RV, Wax MB (2001a) TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1787-1794

Tezel G, Siegmund KD, Trinkaus K, Wax MB, Kass MA, Kolker AE (2001b) Clinical factors associated with progression of glaucomatous optic disc damage in treated patients. *Arch Ophthalmol* 119:813-818

Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB (2003) Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3025-3033

- Tezel G, Wax MB (2004) The immune system and glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 15:80-84
- Tezel G, Yang J, Wax MB (2004) Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Res Bull* 62:473-480
- Tezel G, Wax MB (2007) Glaucoma. *Chem Immunol Allergy* 92:221-227
- Tezel G, Yang X, Luo C, Peng Y, Sun SL, Sun D (2007) Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:705-714
- Tezel G, Yang X, Luo C, Sun D, Kaplan HJ (2008) T cell-mediated autoimmune component of glaucomatous neurodegeneration in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:E-Abstract 3699
- Tezel G, the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group (2009) The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1001-1012
- Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH, Kaplan HJ (2010) Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5071-5082
- Tezel G (2011) The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress. *Exp Eye Res* 93:178-186
- Tezel G (2013) Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 13:23-31
- Thanos S, Vidal-Sanz M, Aguayo AJ (1987) The use of rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) as an anterograde and retrograde tracer in the adult rat visual system. *Brain Res* 406:317-321
- Thanos S (1991) Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neuroscience Letters* 127: 108-112
- Thanos S (1992) Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res* 588:21-28
- Thanos S, Pavlidis C, Mey J., Thiel HJ (1992) Specific transcellular staining of microglia in the adult rat after traumatic degeneration of carbocyanine-filled retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 55: 101-117
- Thanos S (1993) Function-dependent labelling of microglial cells by means of carbocyanine dyes in vivo. *Clin Neuropathol* 12:298-301
- Thanos S, Richter W (1993) The migratory potential of vitally labelled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int J Dev Neurosci* 11:671-680
- Thanos S, Moore S, Hong Y (1996) Retinal Microglia . *Prog Retin Eye Res* 15:331-361

Thanos S (1999) Genesis, neurotrophin responsiveness, and apoptosis of a pronounced direct connection between the two eyes of the chick embryo: a natural error or a meaningful developmental event? *J Neurosci* 19:3900-3917

Thanos C, Emerich D (2005) Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther* 5:1443-1452

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)) (2009) Handbook for the Use of Animals In Biomedical Research.

The European Parliament and of the Council (2010) Directive 2010/63/EU:protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* L276:33-79

Thery C, Chamak B, Mallat M (1991) Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *Eur J Neurosci* 3:1155-1164

Thomas WE (1992) Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 17:61-74

Thornton P, Pinteaux E, Gibson RM, Allan SM, Rothwell NJ (2006) Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *J Neurochem* 98:258-266

Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J (1991) Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA* 266:369-374

Tokumine J, Kakinohana O, Cizkova D, Smith DW, Marsala M (2003a) Changes in spinal GDNF, BDNF, and NT-3 expression after transient spinal cord ischemia in the rat. *J Neurosci Res* 74:552-561

Tokumine J, Sugahara K, Kakinohana O, Marsala M (2003b) The spinal GDNF level is increased after transient spinal cord ischemia in the rat. *Acta Neurochir Suppl* 86:231-234

Torelli S, Sogos V, Marzilli MA, D'Atri M, Gremo F (1989) Developmental expression of intermediate filament proteins in the chick embryo retina: in vivo and in vitro comparison. *Exp Biol* 48:187-196

Torres-Fernández O (2006) La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica* 26:498-508

Toth P, Straznicky C (1989) Retino-retinal projections in three anuran species. *Neurosci Lett* 104:43-47

Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J (1993) The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55:291-301

Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X, Kidd GJ, Stohlman S, Ransohoff R (2007) Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55:360-368

Tremblay M, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biology* 8:e1000527

Triviño A, Ramírez JM, García-Sánchez J (1986) Anatomía del conducto de Schlemm y sus vías de drenaje. *Arch Soc Esp Oftalmol* 50:379-384

Triviño A, Ramírez AI, Salazar J, Ramírez JJ, García-Sánchez J (1990) Astroцитos retinianos relacionados con los axones de las células ganglionares. Estudio inmunohistoquímico. *Arch Soc Esp Oftalmol Invest* 3:87-92

Triviño A, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1992) Retinal perivascular astroglia: an immunoperoxidase study. *Vision Res* 32:1601-1607

Triviño A, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1997) Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res* 37:1707-1711

Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885

Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, MacLeish PR, Poitry S (1998) Trafficking of molecules and metabolic signals in the retina. *Prog Retin Eye Res* 17:429-442

Tsai DC, Hsu WM, Chou CK, Chen SJ, Peng CH, Chi CW, Ho LL, Liu JH, Chiou SH (2002) Significant variation of the elevated nitric oxide levels in aqueous humor from patients with different types of glaucoma. *Ophthalmologica* 216:346-350

Tsukita S, Ishikawa H, Kurokawa M (1981) Isolation of 10-nm filaments from astrocytes in the mouse optic nerve. *J Cell Biol* 88:245-250

Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, Day TA, Walker FR (2010) Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun* 24:1058-1068

U

Uchiyori Y, Puro DG (1991) Mitogenic and chemotactic effects of platelet-derived growth factor on human retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2689-2695

Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, Yaoeda K, Fukuchi T, Abe H, Ozawa H (1998) Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink. *Jpn J Ophthalmol* 42:337-344

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661

Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47:209-216

Underhill DM, Ozinsky A (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 14:103-110

Urcola JH, Hernández M, Vecino E (2006) Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83:429-437

V

Vaegan, Graham SL, Goldberg I, Buckland L, Hollows FC (1995) Flash and pattern electroretinogram changes with optic atrophy and glaucoma. *Exp Eye Res* 60:697-706

Valentin G (1836) Über den Verlauf und die letzten Enden der Nerven. Gedruckt bei Grass, Barth und Comp.

Valiente-Soriano F, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Ortín-Martínez A, Alarcón-Martínez L, Cánovas I, Bernal JM, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M (2008) Effects of elevated intraocular pressure on the retinal ganglion cell population in adult pigmented mice . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:E-Abstract 5486

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97-108

van Rossum D, Hanisch UK (2004) Microglia. *Metab Brain Dis* 19:393-411

Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100:124-139

Varela HJ, Hernandez MR (1997) Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 6:303-313

Vargas MR, Pehar M, Cassina P, Estevez AG, Beckman JS, Barbeito L (2004) Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite. *In Vivo* 18:269-274

Vazquez-Chona FR, Swan A, Ferrell WD, Jiang L, Baehr W, Chien WM, Fero M, Marc RE, Levine EM (2011) Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. *BMC Neurosci* 12:98-2202-12-98

Vecino E, Garcia-Crespo D, Garcia M, Martinez-Millan L, Sharma SC, Carrascal E (2002) Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision Res* 42:151-157

Velasco A, Jimeno D, Lillo C, Caminos E, Lara JM, Aijon J (1999) Enzyme histochemical identification of microglial cells in the retina of a fish (*Tinca tinca*). *Neurosci Lett* 263:101-104

Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC (2004) Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci* 20:1150-1160

Verkhatsky A, Steinhäuser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412

Verkhatsky A, Butt AM (2007) Introduction to glia. In: Verkhatsky A, Butt AM (eds) *Glial Neurobiology: A Textbook*, 65. John Wiley & Sons, pp 3-12

Viale G, Gambacorta M, Coggi G, Dell'Orto P, Milani M, Doglioni C (1991) Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in normal and diseased human breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418:339-348

Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ (1987) Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7:2894-2909

Vidal-Sanz M, Villegas-Perez MP, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Persistent retrograde labeling of adult rat retinal ganglion cells with the carbocyanine dye dil. *Exp Neurol* 102:92-101

Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas FM, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Aviles-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Perez MP (2012) Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res* 31:1-27

Vieites JM, de la Torre R, Ortega MA, Montero T, Peco JM, Sanchez-Pozo A, Gil A, Suarez A (2003) Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13. *Gene* 311:99-104

Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37:17-21

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Bray GM, Aguayo AJ (1988) Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 8:265-280

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M, Bray GM, Aguayo AJ (1993) Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *J Neurobiol* 24:23-36

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD (1996) Mechanism of retinal ganglion cell loss in inherited retinal dystrophy. *Neuroreport* 7:1995-1999

Villegas-Perez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD (1998) Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol* 392:58-77

Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2002) Bases experimentales de la neuroprotección. In: García-Sánchez J (ed) *Neuroprotección y glaucoma*. Editores Médicos S.A., Madrid, pp 17-32

Virchow R (1846) Über das granuliert Aussehen der Wandungen des Gehirnvatrikels. *Allg Z Psychiatrie* 3:242-250

Virchow R (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Verlag von Meidinger Sohn & Comp., Frankfurt

Virchow R (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. August Hirschwald, Berlín

Vivien D, Ali C (2006) Transforming growth factor-beta signalling in brain disorders. Cytokine Growth Factor Rev 17:121-128

Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, Hyman BT, Sabel BA, Dreyer EB (1996) Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. Invest Ophthalmol Vis Sci 37:1618-1624

Vos JJ, Bouman MA (1964) Contribution of the Retina to Entoptic Scatter. J Opt Soc Am 54:95-100

Vrabec F (1970) Microglia in the monkey and rabbit retina. J Neuropathol Exp Neurol 29:217-224

Vrabec F (1975) Activated human retinal microglia under pathological conditions. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 196:49-60

W

Walker FR, Nilsson M, Jones K (2013) Acute and chronic stress-induced disturbances of microglial plasticity, phenotype and function. Curr Drug Targets 14:1262-1276

Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, Nilsson M (2014) Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. Brain Behav Immun 37:1-14

Walsh DT, Perry VH, Minghetti L (2000) Cyclooxygenase-2 is highly expressed in microglial-like cells in a murine model of prion disease. Glia 29:392-396

Walsh N, Valter K, Stone J (2001) Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. Exp Eye Res 72:495-501

Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu LM, Zhu X, Tso MO (2005a) Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. Neurochem Int 47:152-158

Wang JJ, Mitchell P, Smith W (1997) Is there an association between migraine headache and open-angle glaucoma? Findings from the Blue Mountains Eye Study. Ophthalmology 104:1714-1719

Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B (2002) Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1088-1094

Wang S, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Lund RD (2000b) Progressive optic axon dystrophy and vacuslar changes in rd mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 41:537-545

Wang S, Villegas-Perez MP, Holmes T, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Hurtado-Montalban N, Lund RD (2003) Evolving neurovascular relationships in the RCS rat with age. Curr Eye Res 27:183-196

Wang WH, Millar JC, Pang IH, Wax MB, Clark AF (2005b) Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:4617-4621

- Wang X, Tay S, Ng YK (2000a) An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res* 132:476
- Wang X, Ng YK, Tay SS (2005c) Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats. *J Neurosci Res* 82:674-689
- Wang X, LeVatte TL, Archibald ML, Chauhan BC (2009) Increase in endothelin B receptor expression in optic nerve astrocytes in endothelin-1 induced chronic experimental optic neuropathy. *Exp Eye Res* 88:378-385
- Ward SA, Ransom PA, Booth PL, Thomas WE (1991) Characterization of ramified microglia in tissue culture: pinocytosis and motility. *J Neurosci Res* 29:13-28
- Warren EJ, Allen CN, Brown RL, Robinson DW (2003) Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *Eur J Neurosci* 17:1727-1735
- Wasowicz M, Morice C, Ferrari P, Callebert J, Versaux-Botteri C (2002) Long-term effects of light damage on the retina of albino and pigmented rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:813-820
- Wax MB, Tezel G, Edward PD (1998a) Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma. *Arch Ophthalmol* 116:993-1001
- Wax MB, Tezel G, Saito I, Gupta RS, Harley JB, Li Z, Romano C (1998b) Anti-Ro/SS-A positivity and heat shock protein antibodies in patients with normal-pressure glaucoma. *Am J Ophthalmol* 125:145-157
- Wax MB, Tezel G (2002) Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 26:45-55
- Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil RV, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ (2008) Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *J Neurosci* 28:12085-12096
- Wax MB, Tezel G (2009) Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. *Exp Eye Res* 88:825-830
- Webb M, Barclay AN (1984) Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones. *J Neurochem* 43:1061-1067
- Webster MJ, Rowe MH (1991) Disruption of developmental timing in the albino rat retina. *J Comp Neurol* 307:460-474
- Weinreb RN, Khaw PT (2004) Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 363:1711-1720
- Weinreb RN, Lindsey JD (2005) The importance of models in glaucoma research. *J Glaucoma* 14:302-304
- Weishaupt JH, Klocker N, Bahr M (2005) Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells. *J Mol Neurosci* 26:17-25

Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R (1987) Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132:43-57

Weller RO (1998) Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:885-894

Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91:439-442

Whitmore AV, Libby RT, John SW (2005) Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res* 24:639-662

Wiederholt M (1998) Nitric Oxide and endothelin in aqueous humor outflow regulation. In: Haefliger IO, Flammer J (eds) *Nitric Oxide and Endothelin in the Pathogenesis of Glaucoma*. Lippincott-Raven, New York, pp 168-177

Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21:22-34

Willbold E, Berger J, Reinicke M, Wolburg H (1997) On the role of Müller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *J Hirnforsch* 38:383-396

Williams RW, Strom RC, Rice DS, Goldowitz D (1996) Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice. *J Neurosci* 16:7193-7205

Wilson MA, Molliver ME (1994) Microglial response to degeneration of serotonergic axon terminals. *Glia* 11:18-34

Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-1163

Wilson RB, Kunchithapautham K, Rohrer B (2007) Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2877-2886

Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Puro DG (2000) Energy metabolism in human retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3183-3190

Wohl SG, Schmeer CW, Kretz A, Witte OW, Isenmann S (2009) Optic nerve lesion increases cell proliferation and nestin expression in the adult mouse eye in vivo. *Exp Neurol* 219:175-186

Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S (2010) Proliferative Response of Microglia and Macrophages in the Adult Mouse Eye after Optic Nerve Lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2686-2696

Wolburg H, Liebner S, Reichenbach A, Gerhardt H (1999) The pecten oculi of the chicken: a model system for vascular differentiation and barrier maturation. *Int Rev Cytol* 187:111-159

Woldemussie E, Ruiz G, Wijono M, Wheeler LA (2001) Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2849-2855

Woldemussie E, Wijono M, Ruiz G (2004) Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47:109-119

Wolfs RC, Borger PH, Ramrattan RS, Klaver CC, Hulsman CA, Hofman A, Vingerling JR, Hitchings RA, de Jong PT (2000) Changing views on open-angle glaucoma: definitions and prevalences--The Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3309-3321

Wolter JR (1955a) The astroglia of the human retina and other glial elements of the retina under normal and pathological conditions. *Am J Ophthalmol* 40:88-100

Wolter JR (1955b) The cells of Remak and the astroglia of the normal human retina. *Arch Ophthalmol* 53:832-838

Wolter JR (1956) Perivascular glia of the blood vessels of the human retina, 1957. *Am J Ophthalmol* 44:766-773

Wolter JR (1959) Glia of the human retina. *Am J Ophthalmol* 48:370-393

Wolter JR (1961) Silver carbonate techniques for the demonstration of ocular histology. . In: Smelser G (ed) *The Structure of the Eye*. Academic Press, Inc., New York, pp 117-138

Won MH, Kang TC, Cho SS (2000) Glial cells in the bird retina: immunochemical detection. *Microsc Res Tech* 50:151-160

Woodford BJ, Tso MO, Lam KW (1983) Reduced and oxidized ascorbates in guinea pig retina under normal and light-exposed conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:862-867

Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, Brooke G, Puklavec MJ, Bigler M, Song Y, Jenmalm M, Gorman D, McClanahan T, Liu MR, Brown MH, Sedgwick JD, Phillips JH, Barclay AN (2003) Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* 171:3034-3046

Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1992) A quantitative and morphometric study of the transformation of amoeboid microglia into ramified microglia in the developing corpus callosum in rats. *J Anat* 181 (Pt 3):423-430

Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1993) A quantitative study of the differentiation of microglial cells in the developing cerebral cortex in rats. *J Anat* 182 (Pt 3):403-413

Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA (1994) Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J Neurocytol* 23:258-269

Wu J, Peachey NS, Marmorstein AD (2004) Light-evoked responses of the mouse retinal pigment epithelium. *J Neurophysiol* 91:1134-1142

Wuerker RB, Kirkpatrick JB (1972) Neuronal microtubules, neurofilaments, and microfilaments. *Int Rev Cytol* 33:45-75

Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432

X

Xiao BG, Link H (1998) Immune regulation within the central nervous system. *J Neurol Sci* 157:1-12

Xu H, Chen M, Mayer EJ, Forrester JV, Dick AD (2007a) Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia* 55:1189-1198

Xu H, Dawson R, Forrester JV, Liversidge J (2007b) Identification of novel dendritic cell populations in normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1701-1710

Xu H, Chen M, Forrester JV (2009) Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 28:348-368

Xu HF, Chen MF, Manivannan AF, Lois N FAU - Forrester, John,V., Forrester JV (2008) Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7:58-68

Xu J, Kaur C, Ling EA (1993) Variation with age in the labelling of amoeboid microglial cells in rats following intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. *J Anat* 182 (Pt 1):55-63

Xu J, Ling EA (1994a) Studies of the distribution and functional roles of transitory amoeboid microglial cells in developing rat brain using exogenous horseradish peroxidase as a marker. *J Hirnforsch* 35:103-111

Xu J, Ling EA (1994b) Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *J Anat* 184 (Pt 2):227-237

Xue LP, Lu J, Cao Q, Hu S, Ding P, Ling EA (2006) Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience* 139:723-732

Y

Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T (1998) Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 54:628-640

Yamamoto F, Borgula GA, Steinberg RH (1992) Effects of light and darkness on pH outside rod photoreceptors in the cat retina. *Exp Eye Res* 54:685-697

Yan X, Tezel G, Wax MB, Edward DP (2000) Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 118:666-673

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415

Yang F, Wu L, Guo X, Wang D, Li Y (2013) Improved retinal ganglion cell survival through retinal microglia suppression by a chinese herb extract, triptolide, in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Ocul Immunol Inflamm* 21:378-389

Yang J, Patil RV, Yu H, Gordon M, Wax MB (2001a) T cell subsets and sIL-2R/IL-2 levels in patients with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 131:421-426

Yang J, Tezel G, Patil RV, Romano C, Wax MB (2001b) Serum autoantibody against glutathione S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1273-1276

Yang J, Yang P, Tezel G, Patil RV, Hernandez MR, Wax MB (2001c) Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:365-371

Yang P, Das PK, Kijlstra A (2000) Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocul Immunol Inflamm* 8:149-157

Yang X, Luo C, Peng Y, Sun D, Tezel G (2007) T cell response in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:E-Abstract 3285

Yang X, Luo C, Cai J, Powell DW, Yu D, Kuehn MH, Tezel G (2011) Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to TNF- α /TNFR1 signaling in the glaucomatous human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:8442-8454

Yildirim O, Ates NA, Ercan B, Muslu N, Unlu A, Tamer L, Atik U, Kanik A (2005) Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye (Lond)* 19:580-583

Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, Enaida H, Ishibashi T (2013) Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 120:100-105

Young DB (1992) Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 4:396-400

Yuan L, Neufeld AH (2000) Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 32:42-50

Yuan L, Neufeld AH (2001) Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res* 64:523-532

Z

Zador Z, Stiver S, Wang V, Manley GT (2009) Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol* (190):159-70. doi:159-170

Zahs KR, Newman EA (1997) Asymmetric gap junctional coupling between glial cells in the rat retina. *Glia* 20:10-22

Zeimer RC, Chen K (1987) Comparison of a noninvasive measurement of optic nervehead mechanical compliance with an invasive method. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1735-1739

Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO (2005) Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2992-2999

Zhang C, Tso MO (2003) Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res* 73:840-845

Zhang C, Shen J, Lam TT, Zeng H, Chiang SK, Yang F, Tso M (2005a) Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis* 11:887-895

Zhang C, Lam TT, Tso MO (2005b) Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res* 81:700-709

Zhang D, Hu X, Qian L, Wilson B, Lee C, Flood P, Langenbach R, Hong JS (2009) Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:64-70

Zhang J, Snyder SH (1995) Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:213-233

Zhang J, Wu G, Ishimoto S, Pararajasegaram G, Rao N (1997) Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. *Immunohistochemical study. Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1848-1857

Zhang X, Cheng M, Chintala SK (2004) Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2374-2383

Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J (2012) Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J. Neuroinflammation* 9:247

Zielasek J, Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* 6:191-222

Apéndices

8 Apéndices

Este proyecto de tesis ha dado lugar a varios trabajos, los cuales se enumeran y recogen a continuación.

PUBLICACIONES INDEXADAS

1. ***IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma.***

Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

J Neuroinflammation. 2012 May 14;9:92.

Factor de impacto: 4,350/Q1

2. ***Rod-like microglia are restricted to eyes with laser-induced ocular hypertension but absent from the microglial changes in the contralateral untreated eye.***

de Hoz R, **Gallego BI**, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

PLoS One. 2013 Dec 18;8(12):e83733.

Factor de impacto: 3,730/Q1

Además de los trabajos derivados directamente del proyecto motivo de esta tesis doctoral, se han realizado otras publicaciones relacionadas con la línea de investigación glaucoma y glía:

PUBLICACIONES INDEXADAS

1. ***Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma.***

Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Ortín-Martínez A, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Nov;51(11):5690-6

OTRAS PUBLICACIONES NO INDEXADAS Y CAPÍTULOS DE LIBROS

1. ***Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa.***

Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Garcia ES, Triviño A, Ramírez JM

Rev Esp Glaucoma Hipertensión Ocular. 2013 3(2):197-211

2. ***Glia and blood retinal barrier: effects of ocular hypertension.*** En Cardiovascular diseases.

Ramírez JM, Rojas B, **Gallego BI**, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, García-Martín ES, Triviño A.

Edit. iConcept press ltd. 2013. En prensa (Capítulo de libro). ISBN: 9788480867214

Los resultados derivados de este trabajo han sido presentados en diferentes congresos científicos nacionales e internacionales.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

NACIONALES

1. Rojas B, Ramírez AI, De Hoz R, **Gallego BI**, Avilés-Trigueros M, Salazar JJ
La PIO disminuye el área ocupada por los astrocitos tanto en los ojo hipertensos como en sus contralaterales (Comunicación en panel)
86 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
Madrid, del 22-25 de septiembre de 2010.
2. Ramírez AI, Rojas B, de Hoz R, Salazar JJ, **Gallego BI**, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Ramírez JM, Triviño A.
Afectación de la macroglía en el ojo contralateral en un modelo de glaucoma experimental en ratón (Comunicación oral)
V Reunión de la Red Glial Española
Málaga, 16 y 17 de diciembre de 2010
3. Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, **Gallego BI**, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M., Triviño A, Ramírez JM
Afectación de la macroglía en el ojo contralateral en un modelo de glaucoma experimental en rata (Comunicación oral)
V Reunión de la Red Glial Española
Málaga, 16 y 17 de diciembre de 2010
4. De Hoz R, Gallego BI, Salazar JJ., Ramírez AI, Rojas B, Triviño A.
Efectos de la hipertensión ocular en la macroglía retiniana y las células ganglionares del ratón: cambios en el ojo contralateral no tratado (Comunicación en panel)
87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
Oviedo, del 21-24 de septiembre de 2011.
5. Rojas B, **Gallego BI**, Ramírez AI, Salazar JJ, De Hoz R, Ramírez JM
Efectos de la hipertensión ocular en la microglía retiniana del ratón: cambios en el ojo contralateral no tratado (Comunicación en panel)
87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
Oviedo, del 21-24 de septiembre de 2011.

6. De Hoz R, **Gallego BI**, Ramírez AI, Salazar JJ, Rojas B, Ramírez JM
Sobreexpresión del MHC-II en la microglía y en la macroglía retiniana en un modelo de hipertensión ocular en ratón (Comunicación en panel)
88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
Barcelona, del 26-29 de septiembre de 2012.
7. Salazar JJ, de Hoz R, Ramírez AI, Rojas B, **Gallego BI**, Triviño A.
Efectos de la hipertensión ocular en la población astrocitaria retiniana: cambios cualitativos y cuantitativos (Comunicación en panel)
88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
Barcelona, del 26-29 de septiembre de 2012.
8. Rojas B, **Gallego BI**, de Hoz R, Ramírez AI, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño T, Ramírez JM.
Reactivación microglial: cambios cualitativos y cuantitativos en la retina contralateral en un modelo de glaucoma unilateral. (Comunicación oral)
9 Congreso de la Sociedad Española de Glaucoma.
Murcia, del 13-15 de marzo de 2012
9. **Gallego BI**, Ramírez AI, Salazar JJ, Rojas B, de Hoz R, García ES, Triviño A, Ramírez JM.
La microglía en bastón no aparece entre los cambios microgliales de la retina contralateral en un modelo de glaucoma (Comunicación en panel)
VI Reunión de la Red Glial Española.
Oviedo, del 24-25 de septiembre de 2013

INTERNACIONALES

10. Ramírez AI, Triviño A, Ramírez JM, Rojas B, Salazar JJ, de Hoz R, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M., Vidal-Sanz Manuel, Avilés-Trigueros M.
Effects of Laser-Induced Ocular Hypertension in Astroglia and Ganglion Cells of Adult Mice Retinas. A Qualitative and Quantitative Study (Comunicación en panel)
Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) del 2-6 de Mayo de 2010.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010 51: E-Abstract 2120, 51: E-Abstract, 2120- 2120

11. Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, De Hoz R, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M.
Effects of ocular hypertension in astroglia and ganglion cells in a mouse model
 (Comunicación oral)
 Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (SIRCOVA). Co-
 patrocinio Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). (Annual
 Meeting)
 Valencia, del 19-20 de junio de 2010.
 Ophthalmic Research (Annual Congress of SIRCOVA), 44(1), 57-80. DOI:
 10.1159/000314632. Karger.

12. Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, **Gallego BI**, Avilés-Triguero M.
Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma (Comunicación en panel)
 Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (SIRCOVA). Co-
 patrocinio Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). (Annual
 Meeting)
 Valencia, del 19-20 de junio de 2010.
 Ophthalmic Research (Annual Congress of SIRCOVA), 44(1), 57-80. DOI:
 10.1159/000314632. Karger.

13. Rojas B, de Hoz R, Salazar JJ, Ramírez AI, **Gallego BI**, Ramírez JM, Salinas-Navarro M.,
 Ortín-Martínez A and Triviño A
Quantification of GFAP and NF-200+ retinal ganglion cells in contralateral mice retina to experimental glaucoma (Comunicación oral)
 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European
 Association for Vision and Eye Research (EVER-2011).
 Creta (Grecia), del 5 al 8 de octubre de 2011
 Acta Ophthalmologica. 2011; 89: 0. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2011.2133.x

14. **Gallego BI**, de Hoz R, Ramírez AI, Salazar JJ, Rojas B, Triviño A, Valiente-Soriano F.,
 Salinas-Navarro M. and Ramírez JM
MHC-II Glial upregulation in contralateral mice retina to experimental glaucoma
 (Comunicación oral)
 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European
 Association for Vision and Eye Research (EVER-2011).
 Creta (Grecia), del 5 al 8 de octubre de 2011
 Acta Ophthalmologica. 2011; 89: 0. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2011.2133.x

15. **Gallego BI**, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M., Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano F., Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez M.P., Vidal-Sanz M., Triviño A and Ramírez JM

MHC-II changes in the glia of contralateral mice retina to experimental glaucoma
(Comunicación oral)

Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (SIRCOVA). Co-patrocinio Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). (Annual Meeting)

Valencia, 4 y 5 de noviembre de 2011.

Ophthalmic Research (Annual Congress of SIRCOVA), 46(1): 221-260. DOI: 10.1159/00033301544. Karger.

16. Ramírez JM, de Hoz R, Salazar JJ, Ramírez AI, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M., Ortín-Martínez A, Villegas-Pérez M.P., Triviño A (**Comunicador Gallego BI**)

IOP induces changes in the GFAP-labelled retinal area but not in astrocyte number in mice retina contralateral to experimental glaucoma (Comunicación oral)

Pan-American Association of Ophthalmolgy.

Pan-American Research Day (Annual Meeting)

Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) 5 de mayo de 2012.

17. Rojas B, Salazar JJ, Ramírez AI, de Hoz R, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M., Alarcón-Martínez L., Ortín-Martínez A, Vidal-Sanz M., Triviño A, Ramírez JM

Microglial population in contralateral mice retina to experimental glaucoma: a qualitative and quantitative study (Comunicación oral)

Pan-American Association of Ophthalmolgy.

Pan-American Research Day (Annual Meeting)

Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) 5 de mayo de 2012.

18. **Gallego BI**, Ramírez AI, de Hoz R, Salazar JJ, Rojas B, Triviño A, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M., Avilés-Trigueros M., Ramírez JM

IOP induces MHC-II overexpression in microglia and macroglia in contralateral mice retina to experimental glaucoma (Comunicación oral)

Pan-American Association of Ophthalmolgy.

Pan-American Research Day (Annual Meeting)

Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) 5 de mayo de 2012.

19. Ramírez JM, de Hoz R, Salazar JJ, Ramírez AI, Rojas B, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M., Ortín-Martínez A, Villegas-Pérez M.P., Triviño A
IOP induces changes in the GFAP-labelled retinal area but not in astrocyte number in mice retina contralateral to experimental glaucoma (Comunicación en panel)
 Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
 Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) del 6-9 de mayo de 2012.
 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010 51: E-Abstract 2120, 51: E-Abstract, 2120- 2120

20. Rojas B, Salazar JJ, Ramírez AI, de Hoz R, **Gallego BI**, Salinas-Navarro M., Alarcón-Martínez L., Ortín-Martínez A, Vidal-Sanz M., Triviño A, Ramírez JM
Microglial population in contralateral mice retina to experimental glaucoma: a qualitative and quantitative study (Comunicación en panel)
 Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
 Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) del 6-9 de mayo de 2012.
 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010 51: E-Abstract 2120, 51: E-Abstract, 2120- 2120

21. **Gallego BI**, Ramírez AI, de Hoz R, Salazar JJ, Rojas B, Triviño A, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M., Avilés-Trigueros M., Ramírez JM
IOP induces MHC-II overexpression in microglia and macroglia in contralateral mice retina to experimental glaucoma (Comunicación en panel)
 Meeting of Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)
 Fort Lauderdale, Florida (Estados Unidos de América) del 6-9 de mayo de 2012.
 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010 51: E-Abstract 2120, 51: E-Abstract, 2120- 2120

22. de Gracia P., **Gallego BI**
A new automatic method for counting microglial cells in healthy and glaucomatous retinas (Comunicación oral)
 American Academy of Optometry (AAO)
 Phoenix (Estados Unidos de América) del 24-27 de octubre de 2012

23. Salazar JJ, **Gallego BI**, Rojas B, Triviño A, Ramírez JM, de Gracia P.
A new automatic method for counting microglial cells in wholemount mice retinas (Comunicación oral)
 Sociedad de Investigación de Retina de la Comunidad Valenciana (SIRCOVA). Copatrocinio Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). (Annual Meeting)
 Valencia, del 6-8 de junio de 2013.
 Ophthalmic Research (Annual Congress of SIRCOVA), 50(1), 27-53. DOI: 10.1159/000351623. Karger.

24. de Hoz, R, **Gallego BI**, Rojas B, Salazar JJ, Ramírez AI, Triviño A, Valiente-Soriano FJ, Vidal-Sanz M., Ramírez JM
IOP Induces upregulation of mhc-ii and gfap in the glia of contralateral mice retina to experimental glaucoma (Comunicación poster)
 XI European Meeting on Glial Cells in Health and Diseases
 Berlín, Alemania del 3-6 de julio de 2013.
 Glia 2013; 61(S1):S49 - S216. DOI: 10.1002/glia.22530.

25. Salazar JJ, **Gallego BI**, Ramírez AI, Rojas B, de Hoz R, Triviño A, Ramírez JM, de Gracia P.
A new algorithm for counting microglial cells in wholemount mice retinas
 (Comunicación poster)
 XI European Meeting on Glial Cells in Health and Diseases
 Berlín, Alemania del 3-6 de julio de 2013.
 Glia 2013; 61(S1):S49 - S216. DOI: 10.1002/glia.22530.

26. Triviño A, **Gallego BI**, Rojas B., de Hoz, R, Ramírez AI, Salazar JJ, Valiente-Soriano FJ, Villegas-Pérez M.P., Ramírez JM
IOP induces qualitative but not quantitative changes in astrocytes in mice retina contralateral to experimental glaucoma (Comunicación poster)
 XI European Meeting on Glial Cells in Health and Diseases
 Berlín, Alemania del 3-6 de julio de 2013.
 Glia 2013; 61(S1):S49 - S216. DOI: 10.1002/glia.22530.

27. Rojas B., **Gallego BI**, Salazar JJ, de Hoz, R, Ramírez AI, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M., Ramírez JM, Triviño A (Comunicación poster)
Microglial activation In Contralateral Mice Retina To Experimental Glaucoma
 (Comunicación poster)
 XI European Meeting on Glial Cells in Health and Diseases
 Berlín, Alemania del 3-6 de julio de 2013.
 Glia 2013; 61(S1):S49 - S216. DOI: 10.1002/glia.22530.

28. **Gallego BI**, de Hoz R, Ramírez AI, Salazar JJ, Rojas B, Triviño A and Ramírez JM .
Rod microglia is absent from microglial changes in mice retina contralateral to experimental glaucoma (Comunicación oral)
 Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European Association for Vision and Eye Research (EVER-2013).
 Niza (Francia), del 18 al 21 de septiembreoctubre de 2013
 Acta Ophthalmologica. 2013; 89: 0. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2013.1741.x

29. de Hoz R, **Gallego BI**, Rojas B, Ramírez AI, Salazar JJ, Triviño A, de Gracia P and Ramírez JM.

A new automatic method for microglial-cell quantification in whole-mount mouse retinas (Comunicación en panel)

Joint European Research Meeting in Ophthalmology and Vision. European Association for Vision and Eye Research (EVER-2013).

Niza (Francia), del 18 al 21 de septiembreoctubre de 2013

Acta Ophthalmologica. 2013; 89: 0. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2013.T010.x

Apéndice a

RESEARCH

Open Access

IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma

Beatriz I Gallego^{1,2}, Juan J Salazar^{1,2}, Rosa de Hoz^{1,2}, Blanca Rojas^{1,3}, Ana I Ramírez^{1,2}, Manuel Salinas-Navarro⁴, Arturo Ortín-Martínez⁴, Francisco J Valiente-Soriano⁴, Marcelino Avilés-Trigueros⁴, Maria P Villegas-Perez⁴, Manuel Vidal-Sanz⁴, Alberto Triviño^{1,3} and Jose M Ramírez^{1,3*}

Abstract

Background: Ocular hypertension is a major risk factor for glaucoma, a neurodegenerative disease characterized by an irreversible decrease in ganglion cells and their axons. Macroglial and microglial cells appear to play an important role in the pathogenic mechanisms of the disease. Here, we study the effects of laser-induced ocular hypertension (OHT) in the macroglia, microglia and retinal ganglion cells (RGCs) of eyes with OHT (OHT-eyes) and contralateral eyes two weeks after laserling.

Methods: Two groups of adult Swiss mice were used: age-matched control (naïve, n = 9); and lasered (n = 9). In the lasered animals, both OHT-eyes and contralateral eyes were analyzed. Retinal whole-mounts were immunostained with antibodies against glial fibrillary acid protein (GFAP), neurofilament of 200kD (NF-200), ionized calcium binding adaptor molecule (Iba-1) and major histocompatibility complex class II molecule (MHC-II). The GFAP-labeled retinal area (GFAP-RA), the intensity of GFAP immunoreaction (GFAP-IR), and the number of astrocytes and NF-200 + RGCs were quantified.

Results: In comparison with naïve: i) astrocytes were more robust in contralateral eyes. In OHT-eyes, the astrocyte population was not homogeneous, given that astrocytes displaying only primary processes coexisted with astrocytes in which primary and secondary processes could be recognized, the former having less intense GFAP-IR ($P < 0.001$); ii) GFAP-RA was increased in contralateral ($P < 0.05$) and decreased in OHT-eyes ($P < 0.001$); iii) the mean intensity of GFAP-IR was higher in OHT-eyes ($P < 0.01$), and the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with higher intensity levels was increased in contralateral ($P = 0.05$) and in OHT-eyes ($P < 0.01$); iv) both in contralateral and in OHT-eyes, GFAP was upregulated in Müller cells and microglia was activated; v) MHC-II was upregulated on macroglia and microglia. In microglia, it was similarly expressed in contralateral and OHT-eyes. By contrast, in macroglia, MHC-II upregulation was observed mainly in astrocytes in contralateral eyes and in Müller cells in OHT-eyes; vi) NF-200+RGCs (degenerated cells) appeared in OHT-eyes with a trend for the GFAP-RA to decrease and for the NF-200+RGC number to increase from the center to the periphery ($r = -0.45$).

Conclusion: The use of the contralateral eye as an internal control in experimental induction of unilateral IOP should be reconsidered. The gliotic behavior in contralateral eyes could be related to the immune response. The absence of NF-200+RGCs (sign of RGC degeneration) leads us to postulate that the MHC-II upregulation in contralateral eyes could favor neuroprotection.

Keywords: Experimental glaucoma, Mice, Microglia, Astrocytes, Müller cell, Retina, GFAP, MHC-II

* Correspondence: ramirezj@med.ucm.es

¹Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

³Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Ocular hypertension is a major risk factor for glaucoma, a neurodegenerative disease characterized by an irreversible decrease of ganglion cells and their axons, the functional impact of which leads to a visual-field loss [1-7].

Although the hypothesis is generally accepted that glaucomatous damage is a consequence of axonal degeneration that ends with the death of ganglion cells, recent studies have shown the important role played by glia in the pathogenic mechanism of the disease [8-12].

Under normal conditions, astrocytes and Müller glia make contact with retinal neurons, providing stability to the neural tissue [13]. Physiological studies have demonstrated that both cell populations perform equivalent functions, including: storing glycogen, providing glucose to neurons, regulating the levels of extracellular potassium, playing a major role in the regulation and metabolism of neurotransmitters such as GABA, helping to remove CO₂ from the retina, and contributing to the maintenance of water homeostasis in the retina [12,14-18]. Furthermore, astrocytes as well as Müller cells can induce blood-brain barrier properties within the vascular endothelial cells [19].

Resident glia in the retina and optic-nerve head alter their gene-expression profile during activation, presumably exerting neuroprotective or damaging influences at different phases of disease progression [20]. In the glaucomatous optic neuropathy, glial cells from the retina and from the optic nerve show abnormal behavior. This results in the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) in Müller glia and the appearance of reactive astrocytes, which are characterized by a change in their form and their GFAP expression [21].

The neurofilaments from retinal ganglion cells (RGCs) undergo alterations in glaucoma. It has been reported that the excitatory neurotransmitter glutamate, which exhibits elevated extracellular levels in pathologies such as glaucoma, can enhance the phosphorylation of neurofilaments [22] and induce the accumulation of neurofilaments in the neuronal soma [23]. Additionally, the interference of axonal transport has been proposed as one possible mechanism of neurofilament-induced pathology and the disorganized neurofilaments can induce selective neuronal degeneration and death [24].

It has been suggested that reactive glial cells could help protect retinal ganglion cells, as they can be a source of neurotrophic factors [25]. On the contrary, reactive glial cells can exacerbate neuronal damage and may become one of the etiologies of glaucoma through the release of cytokines, reactive oxygen species, and functional disorders of the glutamate uptake in Müller cells [26,27]. This could negatively influence ganglion cells, which could lose their normal functional support [28,29]. In this regard, the colocalization of caspase 3

and GFAP in astrocytes and Müller glia in glaucomatous retina has indicated that these cells may be involved in the apoptosis process, in which the increase of nitric oxide (NO) and tumor-necrosis factor (TNF- α) produced by glial cells would lead to the death of retinal ganglion cells exposed to stressful conditions [30,31].

Altered crosstalk between RGCs and microglia, astrocytes or oligodendrocytes has been proposed as an early factor in the pathophysiology of glaucoma [20]. The lack of agreement concerning the role played by the glia in ganglion cells has raised the need for research on both the location and the discrimination of responses which take place simultaneously in the RGCs and glia [8].

The present study analyzes a mouse model of ocular hypertension (OHT), both in the eye with laser-induced OHT (OHT-eyes) and in the contralateral eye. The aim was to determine i) concurrent responses of macroglial and retinal ganglion cells, using specific antibodies as markers against cytoskeletal proteins from both cells: GFAP (a major constituent of the astrocyte cytoskeleton [32] and NF-200kD (a major constituent of the neuronal cytoskeleton, which after axonal injury has an abnormal distribution in the soma and dendrites of the RGCs [33]; and ii) whether there is an inflammatory reaction to OHT by using anti-Iba 1 (a retinal microglial-specific calcium-binding adaptor protein) [34,35] and an antibody against the class II major histocompatibility complex (anti-MHC-II) (a marker for active antigen-presenting cells) [36] and then compare them with retinas from naïve eyes.

Methods

Animals and anesthetics

Experiments were performed on adult male albino Swiss mice (40 to 45 g) obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). The animals were housed in temperature- and light-controlled rooms with a 12-hour light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Light intensity within the cages ranged from 9 to 24 luxes. Animal manipulation followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research, and the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. All surgical procedures were performed under general anesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of Ketamine (75 mg/kg, Ketolar[®], Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and Xylazine (10 mg/kg, Rompún[®], Bayer, S.A., Barcelona, Spain). During recovery from anesthesia, mice were placed in their cages and an ointment containing tobramycin (Tobrex[®]; Alcon S. A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation and infection. Additional measures were taken to minimize discomfort and pain after

surgery. The animals were killed with an i.p. overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Experimental groups

Two groups of mice were considered for study: an age-matched control (naïve, $n = 9$) and a lasered group ($n = 9$). This latter were processed two weeks after lasering.

Induction of ocular hypertension and IOP measurements

To induce OHT, the left eyes of anesthetized mice were treated in a single session with a series of diode laser (Viridis Ophthalmic Photocoagulator-532 nm, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) burns. The laser beam was directly delivered without any lenses, aimed at the limbal and episcleral veins. The spot size, duration, and power were 50 to 100 μm , 0.5 seconds and 0.3 W, respectively. Each eye received between 55 to 76 burns.

The intraocular pressure (IOP) of the mice was measured under deep anesthesia in both eyes with a rebound tonometer (Tono-Lab, Tiolat, OY, Helsinki, Finland) [30,37] prior to and 24 to 48 hours and one week after laser treatment for the lasered group and before being killed for the naïve. At each time point, 36 consecutive readings were made for each eye and averaged. To avoid fluctuations of the IOP due to the circadian rhythm in albino Swiss mice [38] or due to the elevation of the IOP itself [39], we tested the IOP consistently around the same time, preferentially in the morning and directly after deep anesthesia in all animals (lasered group and naïve). Moreover, because general anesthesia lowers the IOP in the mouse, we measured the IOP of the treated eye (OHT-eye) as well as the contralateral intact fellow eye in all the experiments.

Immunohistochemistry

The mice were deeply anesthetized, perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). The orientation of each eye was carefully maintained with a suture placed on the superior pole immediately after deep anesthesia and before perfusion fixation. Moreover, upon dissection of the eye, the insertion of the rectus muscle and the nasal caruncle were used as additional landmarks [40]. The eyes were post-fixed for two hours in the same fixative and kept in sterile 0.1 M PB.

The retinas from both groups were dissected and processed as retinal whole-mounts [41]. Of the nine mice included in the lasered group, six were used to quantify the effect of OHT on astrocytes and RGCs while three were used to analyze whether there was an inflammatory response to OHT. The retinas of the mice were double immunostained as described elsewhere [42] with anti-GFAP plus anti-NF-200 (which recognizes both

phosphorylated and dephosphorylated forms of the 200-kD neurofilaments) in order to study the effect of OHT on retinal macroglia and RGC, respectively. The working dilutions were 1/80 for rabbit anti-neurofilament 200 (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Madrid, Spain) and 1/150 for mouse anti-GFAP (GFAP clone GA-5) (Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Madrid, Spain). Binding sites of the primary antibodies were visualized after two days of incubation with the corresponding secondary antibodies: the immunoglobulin fraction of goat anti-mouse antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) diluted 1/100 and goat anti-rabbit antibody conjugated to Texas-red (Vector, Burlingame, CA, USA) diluted 1/50. Vectashield mounting medium for fluorescence with nuclear counterstaining (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (Vector, Burlingame, CA, USA) was used to distinguish one astrocyte clearly from another for counting purposes.

To determine whether there was an inflammatory reaction to OHT, we triple immunostained the retinal whole-mounts with the following primary antibodies: anti-mouse MHC class II (I-A/I-E) (eBioscience, San Diego, CA, USA) in a 1/100 dilution, rabbit anti Iba 1 (Wako, Osaka, Japan) in a 1/500 dilution and chicken anti-GFAP (Millipore, Massachusetts, MA, USA) in a 1/100 dilution. Binding sites of the primary antibodies were visualized with the corresponding secondary antibodies: goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/150, donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen) diluted 1/800 and DyLight 405-conjugated donkey anti-chicken (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluted 1/150. Negative controls included replacement of primary and secondary antibodies by normal serum from those species in which the primary antibodies were raised [42].

Retinal analysis

GFAP-labeled retinal area (GFAP-RA). Intensity of GFAP immunoreaction (GFAP-IR). Astrocyte and NF-200+RGC counting

Mice retinal whole-mounts were examined and photographed under a confocal microscope (Leica TCS SP2 AOBS) and a fluorescence microscope (Zeiss, AxioPlan 2 Imaging Microscope) equipped with appropriate filters for fluorescence emission spectra of FITC (Filter set 10, Zeiss) and Texas-red (Filter set 15, Zeiss). Fluorescence microphotographs were taken with the same exposure time (700 ms). Retinal astrocytes and RGCs were quantified by a masking procedure.

To determine the effect of OHT, we quantified astrocytes and NF-200+RGC somas in the retinal whole-mount as follows: In an initial step, NF-200+RGC somas were counted and measured in the retinal whole-mount. Each entire retinal whole-mount was analyzed using the

motorized stage of the microscope to scan the whole preparation along the x-y axis. Thus, all subsequent fields analyzed were contiguous and were examined systematically to ensure that no portion of the retinal whole-mount would be omitted or duplicated. Additionally, so as not to undersample labeled NF-200+RGC somas lying outside the immediate focal plane, we analyzed the whole preparation along the z axis. The NF-200+RGC somas were counted and their size was calculated with the manual counting tool and the measuring tool, respectively, included in the Metamorph Imaging System version 4.5 computer program (© Universal Imaging Corps) in association with an Axioplan 2 Imaging Microscope (Zeiss). The diameter used to estimate NF-200+RGC soma size was the longest distance between opposing cell boundaries when passing through the center of the cell. These procedures were made at 20x, giving up an area of 0.19 mm² per fields analyzed.

In the second step, to evaluate the effect of OHT in astrocytes, equivalent areas of the retina were consistently selected for each retinal whole-mount, which included the optic disc, superior, inferior, nasal, and temporal zones of the retina (13 areas in total for each retina; Figure 1A). Photographs of these areas were taken at 10x, providing an area of 0.78 mm². Astrocytes in mice retina are distributed in such a way that each GFAP-labeled astrocyte can be easily distinguished from others, allowing cell counting. Astrocytes were counted in each selected photograph by using the manual counting tool of the Metamorph Imaging System (Figure 1B).

In addition, to analyze the effect of OHT in GFAP, we used the same selected photographs to determine the GFAP-labeled retinal area (GFAP-RA). For this purpose, we used a computer-assisted morphometric analysis to quantify the retinal area stained with GFAP. The images were thus processed with the Threshold Tool of the Metamorph Imaging System. Thresholding defines a range of gray-scale values found on the pixels of objects of interest, differentiating them from other parts of the image based on the images' gray scale. Areas of the image that were marked with the red threshold overlay (GFAP+ astrocytes and GFAP+ end-foot of the Müller cells; Figure 1C and D) as a visual indicator of the thresholded areas were included in the measurement and processing [43]. Individual images were taken with a digital high-resolution camera (CoolSNAP Photometrics USA) and further processed when required using Adobe Photoshop® CS3 Extended 10.0 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Additionally, to correlate the effect of OHT in both astrocytes and RGCs, NF-200+RGC somas were manually counted in the 13 retinal areas used for the astrocyte study (Figure 1E and F).

Finally, photographs taken at 10x were used to determine the intensity of the GFAP-IR. For this, we used MATLAB (© MathWorks, Inc) and the Metamorph

Imaging System. MATLAB is a high-level technical computing language that can be used for image processing. Some tools of the program allowed us to create absolute pseudocolor intensity maps based in a gray scale ranging from zero to 4,095 (12 bits images). All maps had the same preset color scale that assigned a color to each intensity value (Figure 2), allowing us to identify different intensity levels of the GFAP-IR (Müller cells plus astrocytes) among groups of study. In addition, MATLAB was used to quantify the mean intensity of the GFAP-IR and the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with higher intensity levels.

The GFAP intensity of individual astrocytes in OHT-eyes was quantified in each selected photograph by using the pixel-value information associated with the manual counting tool of the Metamorph Imaging System.

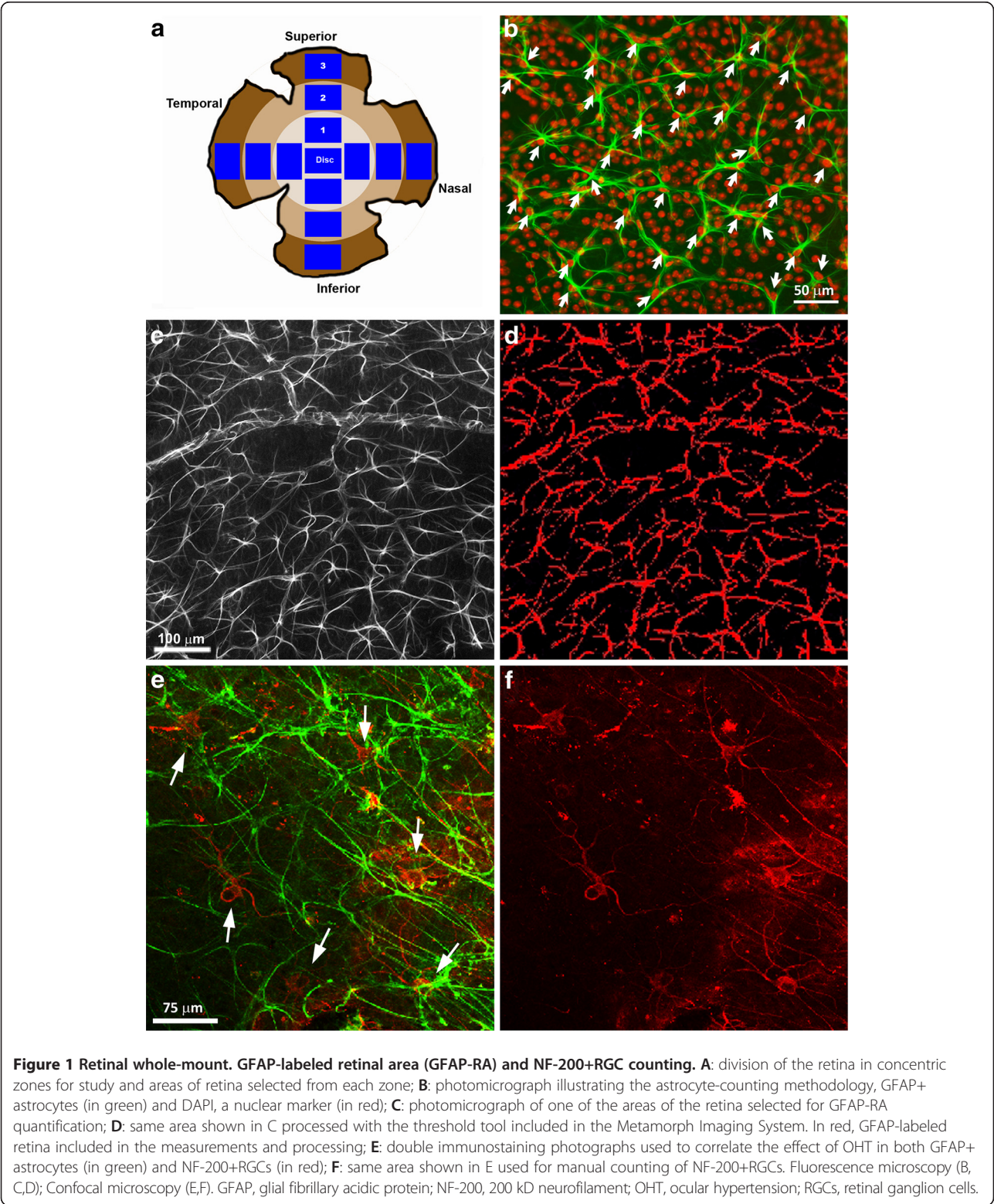
Analysis of Iba-1 and MHC-II expression

Samples processed with MHC-II and Iba-1 antibodies were analyzed and photographed with the ApoTome device (Carl Zeiss, Germany) coupled to a fluorescence microscope (Zeiss, Axioplan 2 Imagin Microscope) equipped with appropriate filters for fluorescence-emission spectra of Alexa fluor 488 (Filter set 10, Zeiss), Alexa fluor 594 (Filter set 64, Zeiss) and DyLight 405 (Filter set 49, Zeiss). The ApoTome uses the 'structured-illumination' method that enables conventional microscopy to create optical sections through the specimen and thereby improve the contrast and resolution along the optical axis.

Statistical analysis

The selected areas of the retina that were taken at 10x were used to quantify the number of astrocytes, GFAP-RA, and the number of RGCs. These were grouped in two different ways for analysis: as areas of the retina (disc, superior, inferior, nasal, and temporal, giving rise to 13 areas per retina) and concentric zones of the retina (disc, central, intermediate and periphery).

Data for the statistical analysis were introduced and processed in a SPSS 19.0 (comprehensive statistical software; SPSS Inc®). Data are shown as mean ± SD. Statistical analyses were performed with the analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test to identify differences among: i) IOP values of the OHT-eyes, the contralateral and naïve eyes; ii) the GFAP-labeled retinal area (GFAP-RA); iii) mean intensity of GFAP-staining; iv) the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with higher intensity levels (above 3,000 in the gray scale); and v) astrocyte number. A *T* test was used to compare: i) the GFAP-RA between the contralateral and the naïve eyes; ii) the number of astrocytes in which primary and secondary processes could be identified between OHT-eyes and naïve; iii) the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with higher intensity levels (above 3,000 in



the gray scale) between the contralateral and the naïve eyes; and iv) the intensity of GFAP-IR between astrocytes in OHT-eyes in which primary and secondary processes could be identified and those in which only primary processes could be identified. Pearson's correlation was used to assess the possible relation between IOP and: i) the GFAP-RA of eyes from lasered eyes; ii) the number of astrocytes in which only primary processes could be

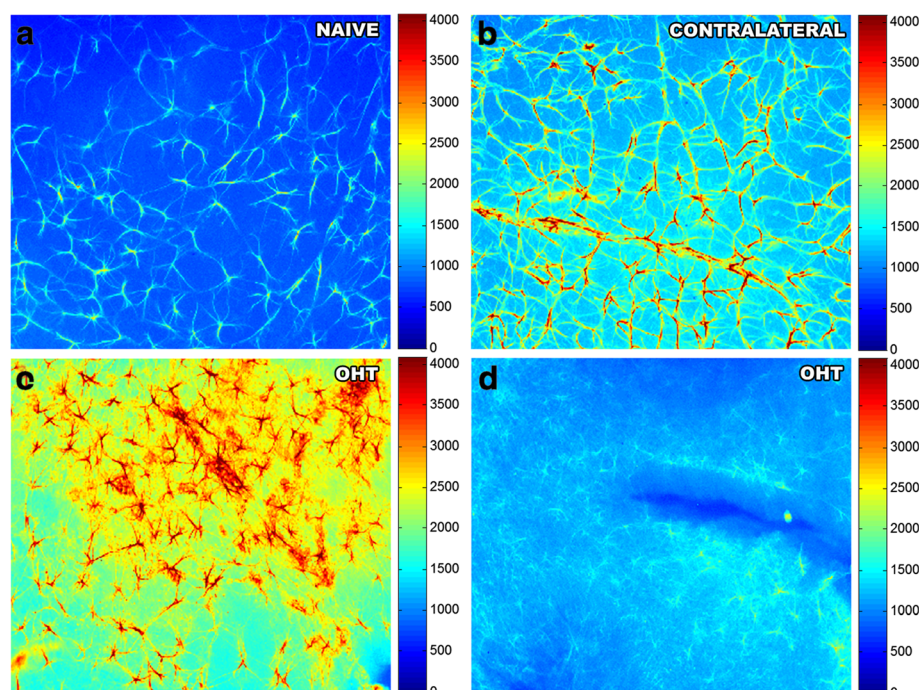


Figure 2 Intensity of GFAP immunoreaction. Pseudocolor-intensity maps drawn with MATLAB program. All maps had the same preset color scale that assigned a color to each intensity value, identifying different intensity levels of the GFAP-IR (Müller cells plus astrocytes). Cool colors represent lower intensity levels while warm colors represent higher intensity levels. Although no differences in mean intensity of GFAP-IR were found between naïve (A) and contralateral (B) eyes, differences were found when the comparison was made by the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with higher intensity levels. C-D microphotographs were taken from the same retina. They illustrate that OHT-eyes had retinal areas with high (C) and low (D) intensity of GFAP-IR, the later having mainly astrocytes in which only primary processes were detected. GFAP-IR, glial fibrillary acidic protein immunoreaction; OHT, ocular hypertension.

identified in OHT-eyes; and iii) the number of NF-200 +RGCs in OHT-eyes. The same correlation was used to determine the possible relation between NF-200+RGCs and: i) the GFAP-RA in OHT-eyes; and ii) the number of astrocytes in which only primary processes could be identified in OHT-eyes.

Results

Laser-induced ocular hypertension

The IOP values of OHT-eyes (29.6 ± 4.4 mmHg) significantly differed from naïve values (16.2 ± 3.1 mmHg; $P < 0.001$, ANOVA with Bonferroni) and contralateral eyes (15.4 ± 1.6 mmHg; $P < 0.001$, ANOVA with Bonferroni). No significant differences were found between contralateral and naïve eyes.

Effects of 15 days of OHT in retinal macroglia (GFAP expression)

Morphological description

- Age-matched control (naïve):* In naïve mice the astrocytes formed a homogeneous plexus on the

nerve-fiber-RGC layer of GFAP+ cells regularly distributed throughout the retina from the disc (Figure 3A) to the periphery. This plexus was constituted by stellate cells that could be easily distinguished from each other, allowing the possibility of manually counting individual cells (Figure 3D, G and J). GFAP+ astrocytes had a rounded body from which numerous primary and secondary processes extended (Figure 3J). In some retinal areas, the Müller cells were GFAP+ and appeared as punctate structures between the astrocytes and their radiating processes (Figure 3D).

- Contralateral eyes:* astrocytes had a rounded cell body from which numerous primary and secondary processes extended. Unlike in naïve eyes, astrocytes were more robust (Figure 3K) and formed a honeycomb network (Figure 3B, E and H). Similar to naïve eyes, GFAP+ Müller cells were observed in some retinal areas (Figure 3E and H).
- Treated eyes (OHT-eyes):* we found astrocytes in which primary and secondary processes could be

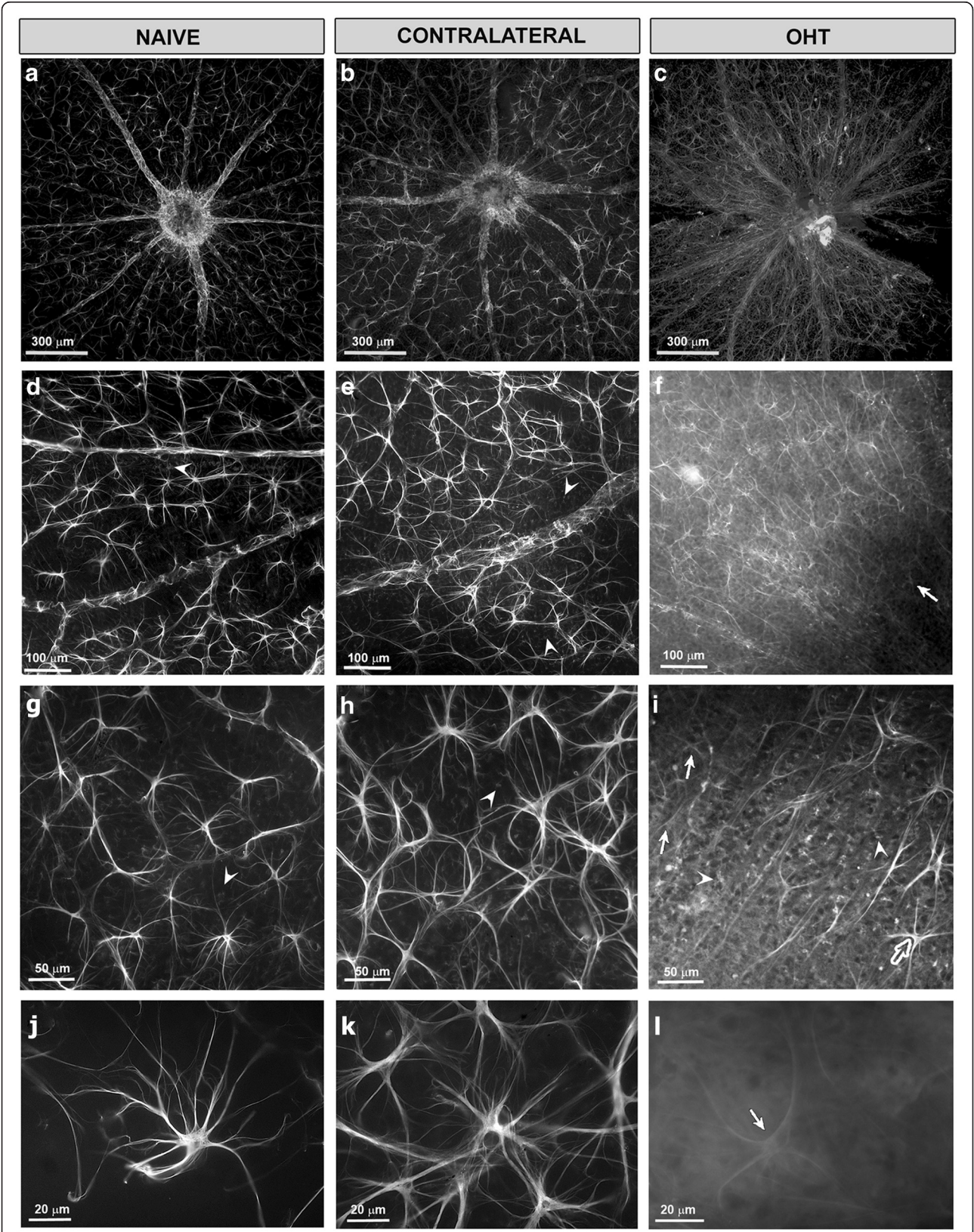


Figure 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 3 GFAP immunostaining of equivalent areas of the retinal whole-mounts. Astrocyte morphology and GFAP-IR of macroglial cells in naïve and in contralateral and OHT-eyes after 15 days of laser-induced OHT. **A-C:** overview of the retinal astrocytes around the optic disc in naïve (A), contralateral (B), and OHT-eyes (C). **D-L:** images correspond to zone 1 of study. In naïve eyes (A, D, G, J), astrocytes formed a homogeneous plexus on the nerve-fiber-RGC layer of cells regularly distributed throughout the retina. This plexus was constituted by stellate cells that could easily be distinguished from each other (D, G). Astrocytes had a rounded body from which numerous primary and secondary processes extended (J) and Müller cells (arrowhead) exhibited punctate GFAP+ structures between the astrocytes (D, G). In contralateral eyes (B, E, H, K), astrocytes were more robust (K) than in naïve eyes (J) and formed a honeycomb network (E, H, K). GFAP+ Müller cells were observed in some retinal areas (arrowhead) in (E, H). Astrocyte morphology in OHT-eyes (C, F, I, L) was not uniform, with astrocytes in which primary and secondary processes could be observed (empty arrow) in (I) and astrocytes in which only primary processes could be observed (arrow) in (I and L). GFAP+ Müller cells (C, F, I) were visible throughout the retina (arrowhead) in (I). Confocal microscopy (A-I); Fluorescence microscopy (J-L). GFAP-IR, glial fibrillary acidic protein immunoreaction; OHT, ocular hypertension; RGC, retinal ganglion cells.

observed at 10x (Figure 3I) and others in which only primary processes could be recognized at this magnification (Figure 3I and L). GFAP+ Müller cells were visible throughout the retina (Figure 3C, F and I).

Astrocyte number and GFAP-labeled retinal area (GFAP-RA)

- i. **Astrocyte number:** The astrocyte number did not differ significantly among the eyes analyzed (215 ± 14 ; 202 ± 19 ; 208 ± 30 for naïve, contralateral, and OHT-eyes, respectively). However, in OHT-eyes the number of astrocytes in which primary and secondary processes could be observed at 10x (129 ± 20) were decreased in comparison with naïve eyes (215 ± 14) ($P < 0.01$, unpaired *T* test). In the six experimental retinas with OHT included in the quantitative study, the mean percentage of astrocytes in which only primary processes could be detected at 10x was 37.8% (78.6 of 208).
- ii. **GFAP-RA:** The GFAP-RA in OHT-eyes ($51,869 \pm 5,461$) was reduced in comparison with contralateral eyes ($P < 0.001$) and naïve eyes ($P < 0.001$) (ANOVA with Bonferroni test) (Figure 3A-I). This difference was observed when the analysis was made both by areas of the retina ($n = 13$) (Figure 4A) and by concentric zones ($n = 4$) (Figure 4B). In contrast to OHT-eyes, the contralateral eyes had significantly more GFAP-RA ($72,783 \pm 13,061$) than naïve ($67,283 \pm 16,318$) ($P < 0.05$, unpaired *T* test) (Figure 3D, E, G, H, J, K).

The analysis of GFAP-RA by zones in each group showed that the GFAP-RA differed among zones in the three groups analyzed (naïve, contralateral, and OHT-eyes: $P < 0.003$; $P < 0.002$ and $P < 0.000$, respectively. ANOVA). The Bonferroni test showed that the optic disc was the only retinal zone that contained significantly more GFAP-RA than the others ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.001$ for naïve,

contralateral and OHT-eyes, respectively). Both in OHT-eyes and in contralateral eyes the GFAP-RA from the concentric zones chosen for study tended to decrease from the disc to the periphery (Figure 4B).

Intensity of GFAP-IR

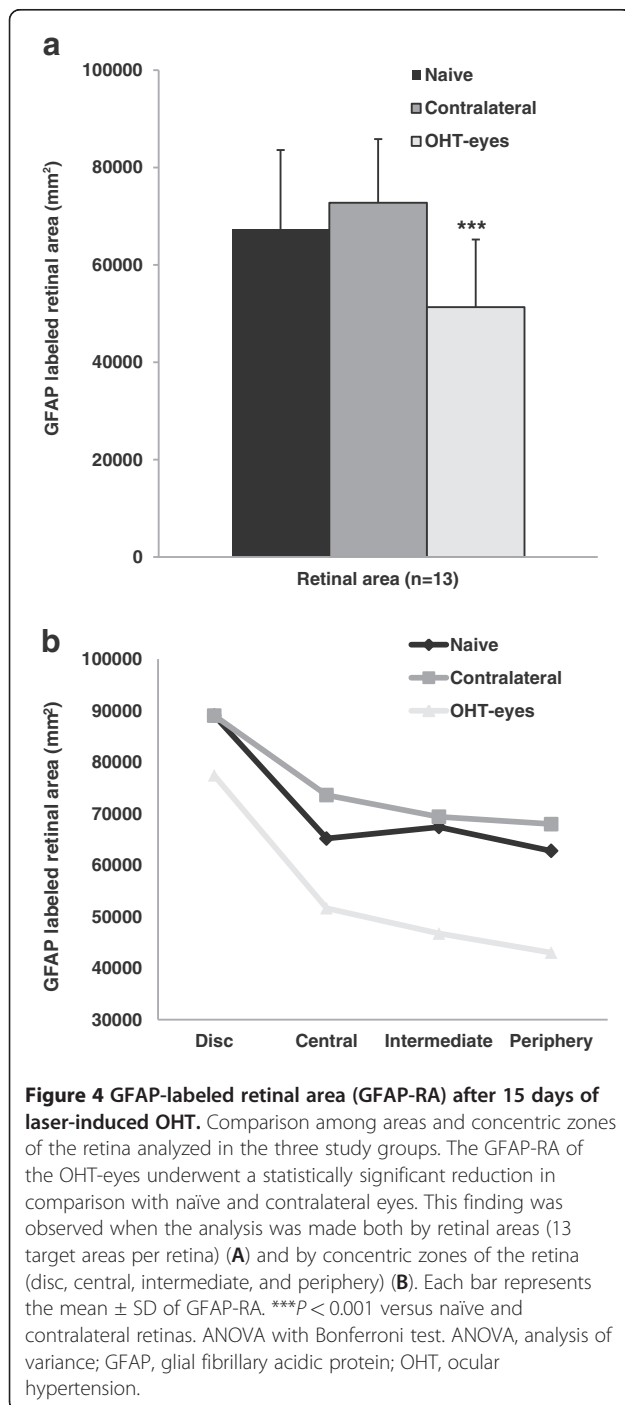
The comparison of the mean intensity of GFAP-IR revealed that the three groups of study eyes differed from each other ($P < 0.01$; ANOVA). The Bonferroni test showed that in OHT-eyes ($2,019 \pm 392$) it was significantly higher than in naïve ($1,330 \pm 162$) ($P < 0.01$). However, when we considered only those retinal areas with the highest intensities of GFAP-IR, we found that in contralateral eyes the mean percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with intensities above 3,000 was higher than in naïve eyes (2.0 ± 1.8 and 0.2 ± 0.3 , respectively; $P = 0.05$; unpaired *T* test) but it did not differ from values for OHT-eyes (5.6 ± 4.3) (Figure 2).

The analysis of OHT-eyes revealed that the intensity of GFAP-IR in astrocytes in which primary and secondary processes could be observed at 10x ($3,021 \pm 534$) (Figure 2C) was significantly higher than those in which only primary processes could be recognized at the same magnification ($2,073 \pm 497$) ($P < 0.001$; paired *T* test; Figure 2D).

Effects of 15 days of OHT in the retinal ganglion cells (NF-200 expression)

Morphological description

- i. **Naïve and contralateral eyes:** RGC axons were uniformly labeled with anti-NF-200, and their morphology was rectilinear. NF-200+RGC staining was rarely observed in the somas or dendrites of RGCs (Figure 5A and B).
- ii. **OHT-eyes:** We observed abnormal NF-200 accumulation both in RGC axons (beads on a string and small varicosities) as well as in the cell bodies and primary dendrites of some RGCs (Figure 5C



and D). NF-200 labeling within the cell soma and primary dendrites varied from a faint but clear staining to an intense labeling (Figure 5D).

RGC counting and size

In the six naïve retinas used for the quantitative study, the number of NF-200+RGCs in each was 0, 0, 1, 2, 2, 3,

respectively, with a mean of 1.3 ± 1.2 . Only one of the six contralateral retinas quantified had one NF-200+RGC. The retina of one of the six eyes with OHT was not suitable for NF-200+RGC counting in the whole retina. In the remaining five OHT-eyes, the number of NF-200 + RGCs found was 520, 611, 259, 509, and 616, with a mean of 503 ± 145.16 . There was a trend ($r = -0.47$, $P < 0.01$ Pearson's correlation) for the GFAP-RA to decrease and for the NF-200+RGC number to increase from the center to the periphery (Figure 6).

NF-200+RGC somas size in OHT-eyes ranged from 11 μ m to 45 μ m. Cells ranging from 17 to 24 μ m accounted for 58.2% of NF-200+RGCs.

Effects of 15 days of OHT in the Iba-1 and MHC-II expression

Age-matched control (naïve)

Retinal microglia from naïve eyes stained with anti-Iba-1 exhibited morphological features typical for this cell type (that is, several thin primary processes emanating from small cell bodies with a ramification at many branching points). Microglia cells were distributed in a parallel mosaic of tiled cells that built networks throughout the entire retina without overlap between their processes (Figures 7A, 8A).

Weak constitutive MHC-II expression was found in some microglial cells (Figure 8B and C) and only rarely in astrocytes (Figure 9B and C) in the naïve retina. Only a small subpopulation of Iba-1+ cells that exhibited dendritiform morphology and that was located in the juxtapapillary area as well as in the marginal region of the retina, had strong MHC-II immunoreaction (Figure 8B inset and 8C inset). We detected no MHC-II immunostaining in Müller cells.

Contralateral eyes

At low magnification (5x), Iba-1+ cells in the contralateral (Figure 7B) retinas formed a denser network than in naïve retinas (Figure 7A). Their morphology differed with regard to naïve in that the somas were larger and the primary and secondary processes were thicker and more branched, with fine, finger-like extensions from the major branches (Figure 8E and H). In comparison to the naïve retina, MHC-II expression in macroglia and microglia of contralateral retinas was upregulated. Overall, Iba-1+ cells were labeled strongly with MHC-II throughout the contralateral retina (Figure 8F and G). MHC-II immunostaining of astrocytes was visible throughout the retina (Figures 9E, F, 10B and C). By contrast, MHC-II immunoreaction of Müller cells was weaker than in astrocytes (Figure 10B and C) and was restricted to some retinal areas (Figure 9E and F).

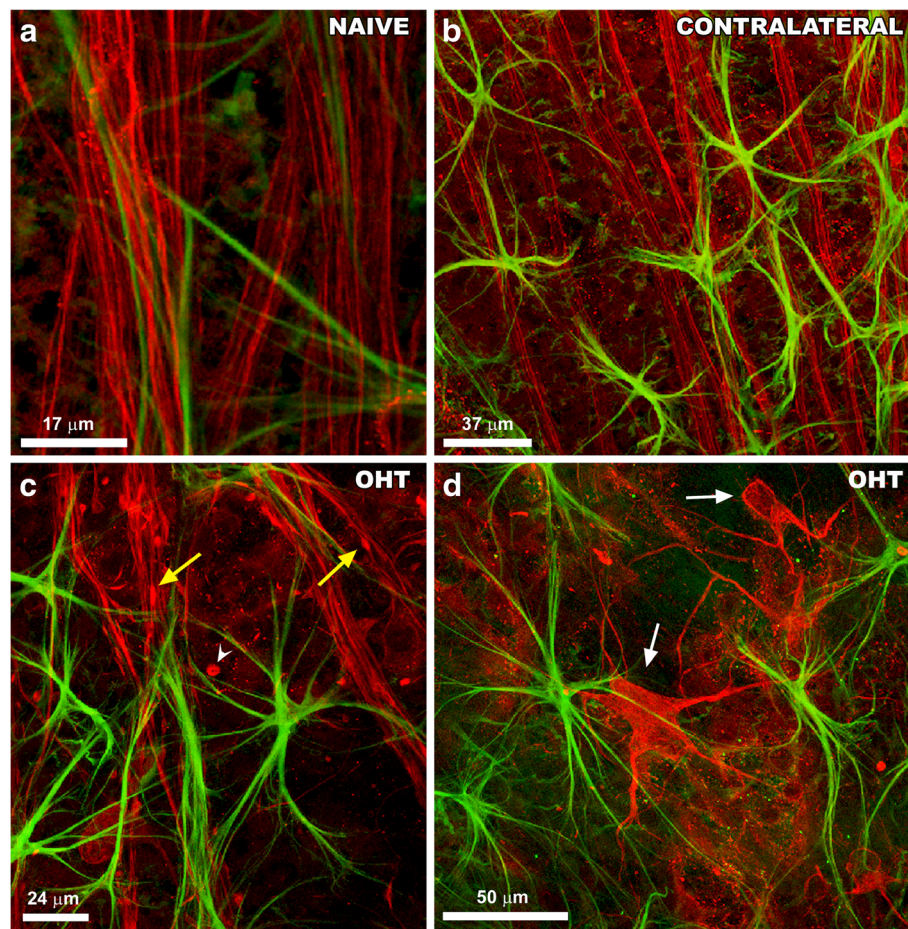


Figure 5 Retinal whole-mount. Double immunostaining for NF-200 and GFAP after 15 days of laser-induced OHT. Axon and RGCs (in red). Macroglia (in green). **A-C:** Images correspond to area 1 of study. **D:** image corresponds to area 3 of the study. **A-B:** NF-200 labelling of RGC axons was rectilinear and uniform in naïve (A) and contralateral eyes (B). NF-200+RGC somas were infrequently observed; **C-D:** beads on a string-like immunostaining (arrowhead) and small varicosities (yellow arrow) in NF-200+ axons in OHT-eyes. Abnormal staining of cell bodies and primary dendrites of RGCs (white arrow) were more frequently found in OHT-eyes (D) than in naïve and contralateral eyes. Confocal microscopy. GFAP, glial fibrillary acidic protein; OHT, ocular hypertension; RGCs, retinal ganglion cells.

Treated eyes (OHT-eyes)

At low magnification (5x) the retinal network formed by microglial cells was denser (Figure 7C) than in the contralateral (Figure 7B) and naïve eyes (Figure 7A). These cells had morphological signs of activation, exhibiting larger cell bodies and thicker and retracted processes (Figure 8I and L) than in contralateral (Figure 8E and H) and in naïve eyes (Figure 8A and D).

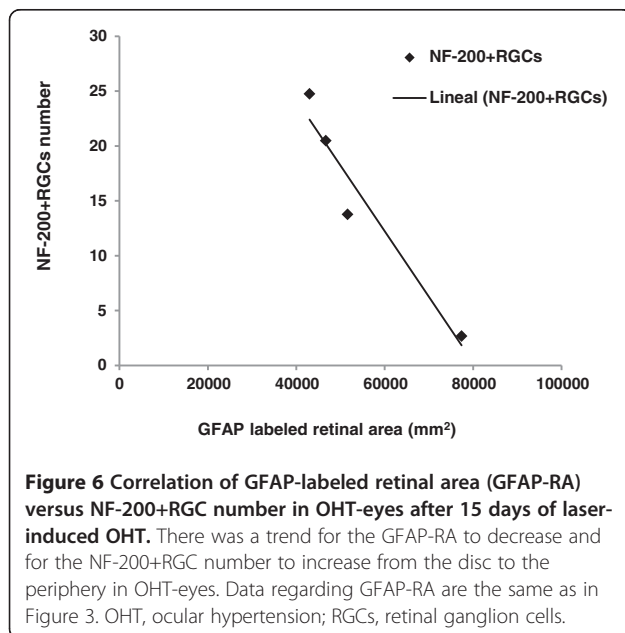
Most Iba-1+ microglia showed high MHC-II immunoreaction (Figure 8J and K) similar to contralateral (Figure 8F and G). No MHC-II astrocytes were found. Müller cells showed higher immunoreaction for MHC-II (Figure 9H and I) than contralateral (Figure 9E and F). MHC-II expression was detected in several groups of Müller cells throughout the retina, preferentially located in the end-foot of the cells (Figure 10E and F). Notably,

GFAP-IR was absent or faint in Müller cells exhibiting MHC-II immunostaining (Figure 10D-F).

Discussion

Experimental rodent models have been used to study glaucomatous neuropathy because they are inexpensive and easier to handle than other animal models (dog and rabbit). In comparison with the rat, the mouse has a major advantage, which is the possibility of being genetically manipulated [44]. In addition, although GFAP+ astrocytes were quantified in rats [45,46], another advantage is that mouse astrocytes are farther apart from each other, allowing us to identify individual cells and count them one by one, more accurately than in rats [43].

Findings in mouse retinal glial cells reported here correspond to changes observed 15 days after lasering the

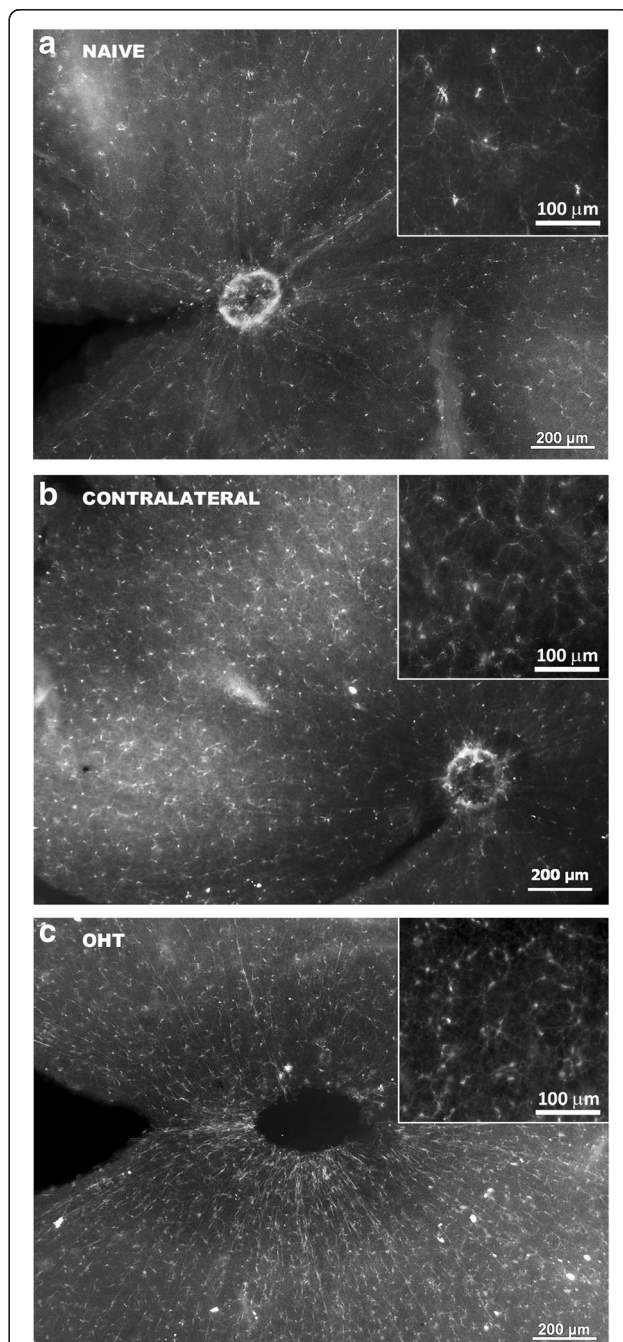


treated eye. In the model of laser-induced OHT used in the present work, a substantial increase of the IOP was evident 24 hours after lasering which continued for four days and then gradually returned to the basal value after the fifth day, so that by one week after lasering, the IOP values in the treated animals were comparable for both eyes [40]. The experimental conditions of the present study constitute a model for human glaucomatous optic neuropathy and thus, can be used to investigate OHT-induced changes undergone by retinal macroglia, microglia, and ganglion cells.

The main reason to use whole-mounted preparations of the retina was to quantify the population of astrocytes and NF-200+RGCs in the whole mouse retina and also to analyze the behavior of glial cells and NF-200+RGCs in different retinal zones. In addition, whole-mounted preparations allow the differentiation of astrocytes from Müller glial cell end-feet which otherwise are not readily distinguishable in a sectional profile [47,48], allowing astrocyte quantification.

The intermediate filament protein GFAP of astrocytes is considered an early marker for retinal injury and is commonly used as an index of gliosis-hypertrophy [21,49,50]. Two relevant morphological alterations in gliotic Müller cells are hypertrophy and the expression of the filament protein GFAP [51].

It has been reported that experimental diabetes in rats induces a differential GFAP expression pattern in the macroglial cells of the retina, reduces GFAP-IR in astrocytes, and increases GFAP-IR in Müller cells [47]. Such opposite reactions in astrocytes and Müller cells in terms of GFAP-IR has been reported in OHT-eyes of



two models of experimental glaucoma in rats [43,45]. In the present study, a similar behavior took place in the macroglial of OHT-eyes in mice.

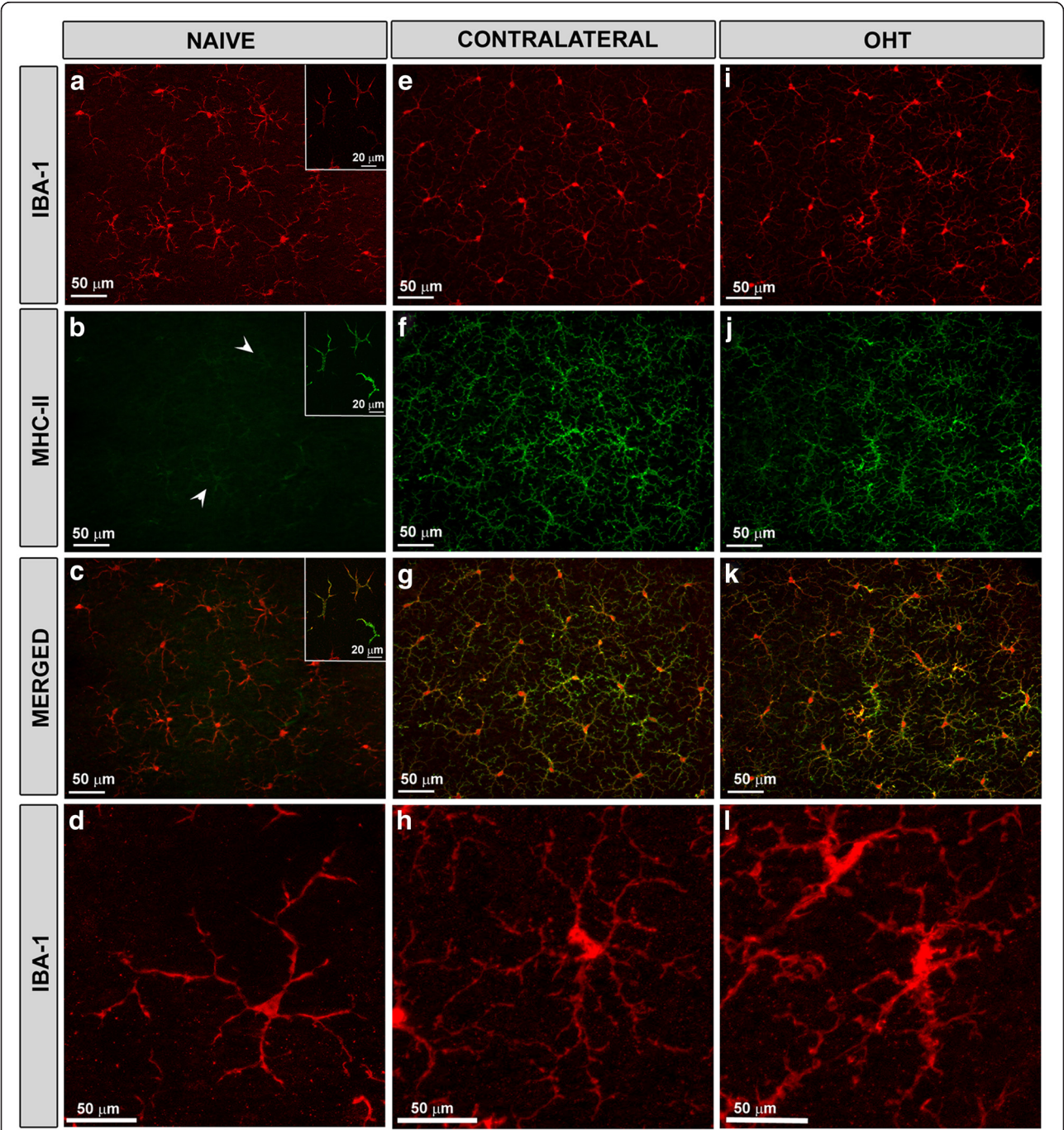


Figure 8 MHC-II expression of Iba-1+ cells in retinal whole-mounts after 15 days of laser-induced OHT. Double immunofluorescence staining for Iba-1 (in red) and MHC-II (in green). **A-C:** in naïve retinas, a constitutive weak expression of MHC-II (arrowheads) was observed in some Iba-1+ cells throughout the retina (B). However, some Iba-1+ cells located in the juxtapapillary area and in the far periphery (A, inset) had a strong constitutive expression of MHC-II (B, inset). **E-H:** in contralateral eyes, Iba-1+ microglial cells of the retina had morphological changes (H) and showed a stronger expression of MHC-II immunoreaction throughout the retina (F,G) in comparison with naïve (B-D). **I-L:** Iba-1+ cell in OHT-eyes had a similar up-regulation of MHC-II (J-K) as did contralateral eyes (F-G); however, the cell bodies were larger and the processes thicker and more retracted (L) than in the contralateral (H) retinas. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome. Iba-1, ionized calcium binding adaptor molecule 1; MHC, major histocompatibility complex; OHT, ocular hypertension.

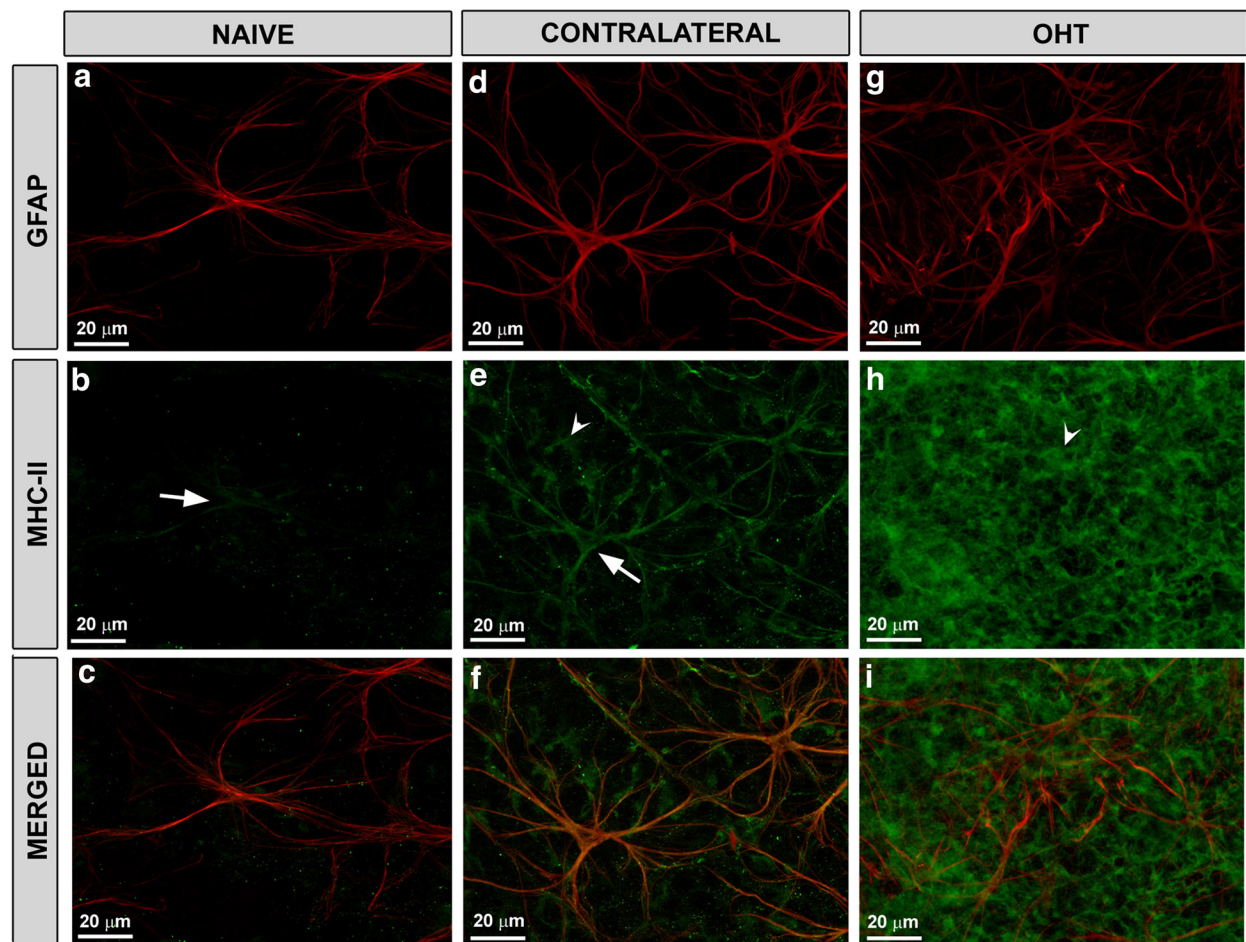


Figure 9 Retinal whole-mount. Double immunostaining for GFAP (red) and MHC-II (in green) after 15 days of laser-induced OHT. A-C: naïve eyes; **D-F:** contralateral eyes; **G-I:** OHT-eyes. In contralateral eyes MHC-II immunoreaction of astrocytes (arrow) and Müller cells (arrowhead) in **(E)** was increased with respect to naïve eyes (arrow) in **(B)**. In OHT-eyes, MHC-II immunoreaction of Müller cells (arrowhead) in **(H)** was notably upregulated in comparison with contralateral **(E)**. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome. GFAP, glial fibrillary acidic protein; MHC, major histocompatibility complex; OHT, ocular hypertension.

Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have shown GFAP to be essential for several astrocyte functions such as proliferation, differentiation, extension of processes, vesicle trafficking, astrocyte-neuron interaction [52], astrogliosis [53] and protection from cerebral ischemia [52].

In comparison to the naïve group, in some astrocytes of OHT-eyes the secondary processes could not be identified at 10x magnification. This difference could have contributed to the decreased GFAP-RA found in OHT-retinas. In addition, the intensity of the GFAP-IR in OHT-eyes was significantly higher than in naïve eyes. Whether or not astrocyte differences in OHT-eyes reflect a functional change, that is, preparation for migration or a switch from neuroprotective functions to immunogenic functions or astrocyte damage, is unknown. Astrocyte changes in OHT-eyes could impair

the neurosupportive role of astrocytes [54] and participate in the death of RGCs reported in a recent parallel study using a comparable methodology to induce OHT [40].

It bears noting that the astrocyte number was similar in the three groups studied (OHT-eyes, contralateral, and naïve eyes). This leads us to postulate that in the retina of OHT-eyes a reactive, non-proliferative gliotic response takes place, similar to that reported in mouse [34,55] and rat [43,55]. It has been suggested that a gliotic non-proliferative response is the consequence of slow degeneration, while rapid degeneration leads to a proliferative gliosis [34,55,56]. However, it should be stressed that, although the number of astrocytes in OHT eyes did not differ significantly from naïve, 37.8% of the astrocytes exhibited morphological changes that could account for the decrease of GFAP-RA in eyes with OHT.

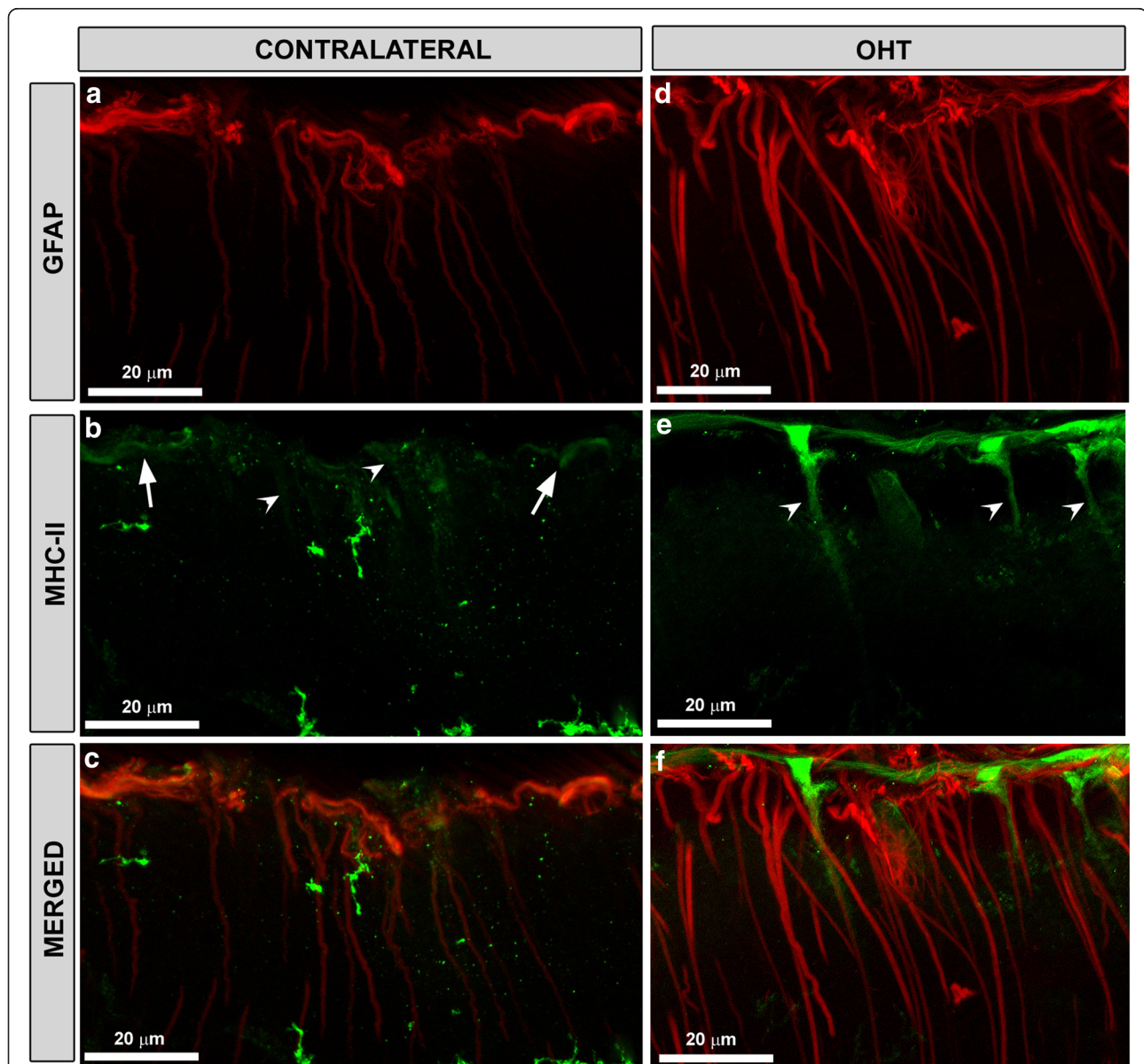


Figure 10 Retinal whole-mount. Double immunostaining for GFAP (in red) and MHC-II (in green) after 15 days of laser-induced OHT.

The pressure exerted by the cover glass on the retinal whole-mount, produced a retinal-like section effect in some retinal borders. **A-C:** in contralateral eyes (A), the GFAP immunoreaction (IR) of Müller cells was weaker than in OHT-eyes (D). MHC-II expression was greater in astrocytes (arrow) than in Müller cells (arrowhead) in (B); **D-F:** in OHT-eyes, MHC-II was upregulated in Müller cells (arrowhead) in (E), the intensity of the staining being greater than in contralateral eyes (arrowhead) in (B). GFAP-IR was absent or faint in those Müller cells exhibiting MHC-II immunostaining (D-F). Both in contralateral (B) and OHT-eyes (E), the retinal-like section effect enabled us to determine that MHC-II upregulation in Müller cells was preferentially located in the end-foot of the cells. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome. GFAP, glial fibrillary acidic protein; MHC, major histocompatibility complex; OHT, ocular hypertension.

NF-200 is a component of the neuronal cytoskeleton. Under normal conditions, anti-NF-200 labels axons of the RGCs but rarely labels RGC somas [57]. Both staining patterns were observed in our naïve group. It is known that an elevated IOP has been associated with the disruption of the axonal transport [58] in different animal models [2,59-62]. A factor deeply involved in

axonal transport is phosphorylation of the heavy neurofilament subunit (NF-H) [63-65]. In a monkey model of chronic ocular hypertension [66], most NF-Hs in RGC axons in the glaucomatous eyes were significantly dephosphorylated by high IOP, which may be a sign of damaged axonal transport. In the present study, the number of NF-200+RGCs was significantly increased in

OHT-eyes in comparison to naïve and contralateral eyes. These RGCs that had accumulated NF-200 in their cell bodies, proximal axon, and primary dendrites most probably represented functionally impaired RGCs as a consequence of the disruption of the axonal transport. The possibility that NF-200+RGCs represent damaged cells is supported by a recent study using comparable methodology to induce OHT, in which eyes with OHT had RT97+RGCs showing typical signs of axotomy-induced neuronal degeneration [40]. Notably, the NF-200+RGC somas of the OHT-eyes in our study tended to be more abundant in areas of the retina having less GFAP-RA. It is possible that an impairment of axonal support exerted by astrocytes could increase the vulnerability of the axon to IOP-induced stress [67]. A possible explanation could be the observations reported by Dibbas *et al.* [68] according to which retinas with OHT showed a downregulation of AQP4 protein and an accumulation of ubiquitin in astrocytes which might not be appropriately transferred to adjacent RGCs. The attenuation of ubiquitination in axons may result in the accumulation of several proapoptotic proteins (that is, caspases, Bax and Bad) [69] and thus contributes to axonal degeneration in glaucoma.

It is known that severe axon insult can result in a rapid Wallerian degeneration of the distal axon [70]. On the contrary, milder insults may result in degeneration via the slower process of axonal dying-back and greater functional connectivity between the soma, proximal axon, and the distal axon segments [71-76]. This situation involving the NF-200+RGCs of the present work, as reported by Soto *et al.* [56,77] could represent RGCs that have suffered an insult but retain their fundamental homeostatic mechanisms, which might provide an opportunity for therapeutic rescue in the human disease.

A striking feature of the contralateral eyes was that macroglia exhibited morphological signs of reactivity that differed from naïve and OHT-eyes: astrocytes were more robust, formed a honeycomb-like network, and had an increase in GFAP-RA. In addition, the percentage of the retinal area occupied by GFAP+ cells with intensities above 3,000 was higher than in naïve eyes but did not differ from that of OHT-eyes. By contrast, the contralateral retinas of two experimental models of glaucoma in rats exhibited a decrease in both the retinal area occupied by astrocytes [43] and the GFAP-IR in astrocytes [43,45]. The different behavior of the retinal macroglia of the contralateral eyes between mice and rats could be species related or could depend on the experimental model such as differences in time to increase pressure or time to return to normal values, among others [67].

It has been reported that the glial-activation response in glaucomatous eyes involves the activation of a glial

immunoregulatory function and antigen-presenting ability [10,78]. The expression of MHC-II in glial cells, required for antigen presentation to T cells, is upregulated in the glaucomatous human retina and optic-nerve head [10,79,80]. In addition, microglial activation has been demonstrated in human eyes with glaucoma [81], in experimental models of OHT [8,80,82,83] and in a genetic mouse model of glaucoma [34]. Our study confirms the microglial activation in eyes with OHT, as evidenced by their morphological changes and stronger expression of MHC-II in most microglial cells compared to naïve eyes. Also, MHC-II immunoreaction in Müller cells supports the idea of immune activation in eyes with OHT.

A lack of relation between immune responses in DBA/2J mice retina and greater IOP has been reported [84] and recently corroborated by Bosco *et al.* [20], who saw no strict correlation between higher IOP and early microglia activation. They concluded that a rise in IOP may not be a contributory factor in these initial changes [20]. It bears mentioning that most microglial cells of the contralateral eyes (normal values of IOP) showed morphological changes and MHC-II upregulation in comparison with naïve eyes. In an experimental model of laser-induced OHT in rats, the contralateral eyes reportedly had a marginal increase in OX42 and OX6 (a MHC-II marker) two hours post-operation before returning to almost normal or normal, respectively, at three days [82]. The microglia of the contralateral retinas of the present study exhibited an upregulation of MHC-II immunoreaction that was widespread and more persistent than in the study of Wang *et al.* [82], given that in our retinas, an intense MHC-II immunoreaction of the microglia was detected throughout the retina after 15 days of laserizing the treated eye. In addition, MHC-II upregulation was observed in both macroglial cell types, preferentially in astrocytes, a fact not reported by Wang *et al.* [82]. The MHC-II upregulation that we detected in the three retinal glial types of our study, which was not temporarily related to surgical eyeball manipulations, led us to postulate that an immunologically mediated process was taking place in contralateral retinas. This glial response may reflect an attempt to maintain tissue homeostasis, perhaps in an effort to protect optic axons from a compromised blood-brain barrier [20,81]. A more sustained insult or prolonged neuronal stress may lead to glial changes that could potentially contribute to neuronal decline.

In the present experiments, we did not estimate RGCs survival, but in a recent parallel study using a comparable methodology to induce OHT, we documented RGC loss using a retrograde tracer applied to both superior colliculi one week prior to animal processing. In that study, the contralateral retinas showed the typical distribution of RGCs throughout the retina [40]. Based on

this data, macroglial activation as well as MHC-II expression on astrocytes and Müller cells of our contralateral eyes could have exerted a neuroprotective effect. It has been suggested that the expression of modest levels of MHC-II may inhibit the activation of invading T cell, whereas overexpression of these molecules may promote the activation of autoimmune T cells, thereby augmenting the inflammatory cascade leading to tissue damage [10,85]. This could be the case for our OHT-eyes in which GFAP-IR and MHC-II expression of Müller cells notably increased in comparison to naïve and contralateral eyes.

Another finding supporting the possible contribution of retinal macroglia to neuronal homeostasis in contralateral eyes and the harmful response of this population in OHT-eyes could be the difference between the contralateral and OHT-eyes in the NF-200+RGC count.

No previous studies are available on the expression of MHC-II on macroglia and microglia in the contralateral eye of adult Swiss mice after 15 days of laser-induced OHT. MHC-II upregulation in contralateral eyes could be secondary to IOP-induced changes in OHT-eyes. Furthermore, the absence of NF-200+RGCs (sign of RGC degeneration) leads us to postulate that the expression of modest levels of MHC-II in macroglial cells in contralateral eyes could offer a protective role.

Conclusions

In summary, after 15 days of unilateral laser-induced OHT, widespread and persistent changes in GFAP and MHC-II expression took place both in the contralateral and OHT-eyes of adult Swiss mice. MHC-II upregulation in Iba-1+ retinal cells was similar in both eyes; however, in the retinal macroglia, MHC-II expression was preferentially located in astrocytes of the contralateral eye and appeared to be restricted to Müller cells in the OHT-eye. The increased antigen-presenting activity in macroglial and microglial cells may be key in the role of the immune system in glaucoma. Knowledge of this role could lead to the development of more effective neuroprotective treatments to modulate the immune response to achieve, on the one hand, tissue repair and neuronal survival, and on the other, a decrease in the immune-mediated neurodegenerative damage.

On the basis of the alterations in the contralateral eye, we conclude that it should not be used as a control eye in this experimental model of laser-induced OHT. Further research is needed to understand the behavior of contralateral eyes in other models of experimental OHT.

Abbreviations

GFAP: Glial fibrillary acidic protein; GFAP-RA: GFAP-labeled retinal area; GFAP-IR: GFAP immunoreaction; Iba-1: Ionized calcium binding adaptor molecule 1; IOP: Intraocular pressure; MHC-II: Major histocompatibility complex class II

molecule; NF-200: Neurofilament of 200kD; OHT: Ocular hypertension; RGCs: Retinal ganglion cells.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Desirée Contreras, Francisca Vargas and Pablo de Gracia for technical assistance, Pilar Serrano Garjo for helping in statistical analysis, and Carla Pey Tena Dávila and David Nesbitt for correcting the English version of this work. This work was supported by RETICS Patología Ocular del Envejecimiento, Calidad Visual y Calidad de Vida (Grant ISCIII RD07/0062/0000 and RD07/0062/0001, Spanish Ministry of Science and Innovation); Fundación Mutua Madrileña (Grant 4131173); BSCH-UCM(GR58)/08; GR35/10-A Programa de Grupos de Investigación Santander-UCM; research grants from the Regional Government of Murcia Fundación Séneca 04446/GERM/07. BIG is currently supported by a predoctoral fellowship from the Universidad Complutense de Madrid.

Author details

¹Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain. ²Escuela Universitaria de Óptica, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28037, Spain. ³Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain. ⁴Department of Ophthalmology, School of Medicine, Campus Universitario de Espinardo, Murcia University, Murcia, Espinardo 30100, Spain.

Authors' contributions

MSN, FJVS, AOM, MAT, MPVP and MVS carried out the development of the animal model and the IOP measurement. BIG, JJS, RdH, BR, AIR, AT, JMR contributed to the immunohistochemical study, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript and revising it critically. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 2 November 2011 Accepted: 14 May 2012

Published: 14 May 2012

References

- Quigley HA, Green WR: The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 1979, **86**:1803-1830.
- Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE: Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 1981, **99**:635-649.
- Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR: Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 1988, **95**:357-363.
- Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR: Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1989, **107**:453-464.
- Quigley HA: Selective citation of evidence regarding photoreceptor loss in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2001, **119**:1390-1391.
- Kerrigan-Baumrind LA, Quigley HA, Pease ME, Kerrigan DF, Mitchell RS: Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:741-748.
- Nork TM, Ver Hoeve JN, Poulsen GL, Nickells RW, Davis MD, Weber AJ, Vaegan, Sarks SH, Lemley HL, Millecchia LL: Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Arch Ophthalmol* 2000, **118**:235-245.
- Johnson EC, Morrison JC: Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma* 2009, **18**:341-353.
- Hernandez MR, Miao H, Lukas T: Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Brain Res* 2008, **173**:353-373.
- Tezel G, the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group: The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, **50**:1001-1012.
- Prasanna G, Krishnamoorthy R, Yorio T: Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Exp Eye Res* 2011, **93**:170-177.
- Newman EA: A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biol* 2004, **1**:245-252.

13. Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J: **Structural specializations of human retinal glial cells.** *Vision Res* 1996, **36**:2029–2036.
14. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A: **Müller cells in the healthy and diseased retina.** *Prog Retin Eye Res* 2006, **25**:397–424.
15. Kumpulainen T, Dahl D, Korhonen LK, Nystrom SH: **Immunolabeling of carbonic anhydrase isoenzyme C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina.** *J Histochem Cytochem* 1983, **31**:879–886.
16. Sofroniew M, Vinters H: **Astrocytes: biology and pathology.** *Acta Neuropathol* 2010, **119**:7–35.
17. Kimelberg HK, Nedergaard M: **Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets.** *Neurotherapeutics* 2010, **7**:338–353.
18. Nag S: **Morphology and properties of astrocytes.** *Methods Mol Biol* 2011, **686**:69–100.
19. Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J: **The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier.** *Neuroscience* 1993, **55**:291–301.
20. Bosco A, Steele MR, Vetter ML: **Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma.** *J Comp Neurol* 2011, **519**:599–620.
21. Varela HJ, Hernandez MR: **Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma.** *J Glaucoma* 1997, **6**:303–313.
22. Asahara H, Taniwaki T, Ohayagi Y, Yamada T, Kira J: **Glutamate enhances phosphorylation of neurofilaments in cerebellar granule cell culture.** *J Neurol Sci* 1999, **171**:84–87.
23. Ackerley S, Grierson AJ, Brownlees J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC: **Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons.** *J Cell Biol* 2000, **150**:165–176.
24. Julien JP, Mushynski WE: **Neurofilaments in health and disease.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998, **61**:1–23.
25. Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ: **Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Müller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:3978–3983.
26. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumert RA, Podos SM, Lipton SA: **Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma.** *Arch Ophthalmol* 1996, **114**:299–305.
27. Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ: **Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:3444–3450.
28. Wang L, Cioffi GA, Cull G, Dong J, Fortune B: **Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**:1088–1094.
29. Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC: **Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, **48**:3161–3177.
30. Wang X, Ng YK, Tay SS: **Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats.** *J Neurosci Res* 2005, **82**:674–689.
31. Tezel G, Wax MB: **Increased production of tumor necrosis factor- α by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells.** *J Neurosci* 2000, **20**:8693–8700.
32. Dahl D, Björklund H, Bignami A: **Immunological markers in astrocytes.** In *Astrocytes: Cell Biology and Pathology of Astrocytes. Volume III*. Edited by Federoff S, Vernadakis A. London: Academic; 1986:1–25.
33. Drager UC, Hofbauer A: **Antibodies to heavy neurofilament subunit detect a subpopulation of damaged ganglion cells in retina.** *Nature* 1984, **309**:624–626.
34. Inman DM, Horner PJ: **Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma.** *Glia* 2007, **55**:942–953.
35. Imai Y, Iwata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S: **A novel gene Iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **224**:855–862.
36. Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H: **Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**:4162–4168.
37. Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T: **Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**:1138–1141.
38. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN: **Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure.** *Exp Eye Res* 2003, **77**:681–686.
39. Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, Denis P, Cooper HM: **Glaucoma alters the circadian timing system.** *PLoS One* 2008, **3**:e3931.
40. Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Ortin-Martinez A, Jimenez-Lopez M, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, de la Villa P, Vidal-Sanz M: **Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice.** *Mol Vis* 2009, **15**:2578–2598.
41. Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J: **Immunohistochemical study of human retinal astroglia.** *Vision Res* 1994, **34**:1935–1946.
42. Triviño A, de Hoz R, Salazar JJ, Ramirez AI, Rojas B, Ramirez JM: **Distribution and organization of the nerve fiber and ganglion cells of the human choroid.** *Anat Embryol (Berl)* 2002, **205**:417–430.
43. Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Gallego BI, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Ortin-Martinez A, Aviles-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramirez JM: **Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**:5690–5696.
44. McKinnon SJ, Schlamp CL, Nickells RW: **Mouse models of retinal ganglion cell death and glaucoma.** *Exp Eye Res* 2009, **88**:816–824.
45. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A: **Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma.** *Exp Eye Res* 2005, **81**:48–56.
46. Rungger-Brandle E, Dosso AA, Leuenberger PM: **Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:1971–1980.
47. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW: **Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:3561–3568.
48. Xue LP, Lu J, Cao Q, Hu S, Ding P, Ling EA: **Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina.** *Neuroscience* 2006, **139**:723–732.
49. Hernandez MR: **The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling.** *Prog Retin Eye Res* 2000, **19**:297–321.
50. Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A: **Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration.** *Exp Eye Res* 2001, **73**:601–615.
51. Reichenbach A, Bringmann A: **Müller cells in the diseased retina.** In *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. Edited by Reichenbach A, Bringmann A. New York: Springer; 2010:215.
52. Middeldorp J, Hol EM: **GFAP in health and disease.** *Prog Neurobiol* 2011, **93**:421–443.
53. Perez-Alvarez MJ, Isiegas C, Santano C, Salazar JJ, Ramírez AI, Triviño A, Ramírez JM, Albar JP, de la Rosa EJ, Prada C: **Vimentin isoform expression in the human retina characterized with the monoclonal antibody 3CB2.** *J Neurosci Res* 2008, **86**:1871–1883.
54. Lorber B, Guidi A, Fawcett JW, Martin KR: **Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma.** *Neurobiol Dis* 2012, **45**:243–252.
55. Bolz S, Schuettauf F, Fries JE, Thaler S, Reichenbach A, Pannicke T: **K(+) currents fail to change in reactive retinal glial cells in a mouse model of glaucoma.** *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008, **246**:1249–1254.
56. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, Son JL, Roberson ED, Steele MR, Inman DM, Vetter ML, Horner PJ, Marsh-Armstrong N: **Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model.** *J Neurosci* 2008, **28**:548–561.
57. Bizzi A, Schaetzle B, Patton A, Gambetti P, Autilio-Gambetti L: **Axonal transport of two major components of the ubiquitin system: free ubiquitin and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP 9.5.** *Brain Res* 1991, **548**:292–299.
58. Mabuchi F, Aihara M, Mackey MR, Lindsey JD, Weinreb RN: **Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, **45**:4352–4358.
59. Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ: **Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000, **41**:764–774.
60. Quigley HA, Anderson DR: **Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977, **16**:640–644.

61. Minckler DS, Tso MO, Zimmerman LE: **A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema.** *Am J Ophthalmol* 1976, **82**:741–757.
62. Anderson DR, Hendrickson A: **Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974, **13**:771–783.
63. Lee MK, Cleveland DW: **Neuronal intermediate filaments.** *Annu Rev Neurosci* 1996, **19**:187–217.
64. Nixon RA, Sihag RK: **Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function.** *Trends Neurosci* 1991, **14**:501–506.
65. Pant HC, Veeranna: **Neurofilament phosphorylation.** *Biochem Cell Biol* 1995, **73**:575–592.
66. Kashiwagi K, Ou B, Nakamura S, Tanaka Y, Suzuki M, Tsukahara S: **Increase in dephosphorylation of the heavy neurofilament subunit in the monkey chronic glaucoma model.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**:154–159.
67. Morrison JC, Cepurna Ying Guo WO, Johnson EC: **Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma.** *Exp Eye Res* 2011, **93**:156–164.
68. Dibas A, Yang MH, He S, Bobich J, Yorio T: **Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury.** *Mol Vis* 2008, **14**:1770–1783.
69. Dahlmann B: **Role of proteasomes in disease.** *BMC Biochem* 2007, **8**(Suppl 1):S3.
70. Conforti L, Adalbert R, Coleman MP: **Neuronal death: where does the end begin?** *Trends Neurosci* 2007, **30**:159–166.
71. Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW: **Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric.** *BMC Neurosci* 2006, **7**:66.
72. Buckingham BP, Inman DM, Lambert W, Oglesby E, Calkins DJ, Steele MR, Vetter ML, Marsh-Armstrong N, Horner PJ: **Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma.** *J Neurosci* 2008, **28**:2735–2744.
73. Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ: **Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:5196–5201.
74. Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SW: **Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma.** *J Cell Biol* 2007, **179**:1523–1537.
75. Whitmore AV, Libby RT, John SW: **Glaucoma: thinking in new ways—a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes?** *Prog Retin Eye Res* 2005, **24**:639–662.
76. Fu CT, Sretavan D: **Laser-induced ocular hypertension in Albino CD-1 Mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010, **51**:980–990.
77. Soto I, Pease ME, Son JL, Shi X, Quigley HA, Marsh-Armstrong N: **Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011, **52**:434–441.
78. Steele MR, Inman DM, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML: **Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, **47**:977–985.
79. Yang J, Yang P, Tezel G, Patil RV, Hernandez MR, Wax MB: **Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, **42**:365–371.
80. Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB: **Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**:3025–3033.
81. Neufeld AH: **Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma.** *Arch Ophthalmol* 1999, **117**:1050–1056.
82. Wang X, Tay SS, Ng YK: **An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma.** *Exp Brain Res* 2000, **132**:476–484.
83. Naskar R, Wissing M, Thanos S: **Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial in the retina of a rat model of glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, **43**:2962–2968.
84. Fan W, Li X, Wang W, Mo JS, Kaplan H, Cooper NG: **Early involvement of immune/inflammatory response genes in retinal degeneration in DBA/2J Mice.** *Ophthalmol Eye Dis* 2010, **1**:23–41.
85. Shao H, Kaplan HJ, Sun D: **Major histocompatibility complex molecules on parenchymal cells of the target organ protect against autoimmune disease.** *Chem Immunol Allergy* 2007, **92**:94–104.

doi:10.1186/1742-2094-9-92

Cite this article as: Gallego et al.: IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of Neuroinflammation* 2012 **9**:92.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Apéndice b

Rod-Like Microglia Are Restricted to Eyes with Laser-Induced Ocular Hypertension but Absent from the Microglial Changes in the Contralateral Untreated Eye

Rosa de Hoz^{1,2}, Beatriz I. Gallego^{1,2}, Ana I. Ramírez^{1,2}, Blanca Rojas^{1,3}, Juan J. Salazar^{1,2}, Francisco J. Valiente-Soriano⁴, Marcelino Avilés-Trigueros⁴, Maria P. Villegas-Perez⁴, Manuel Vidal-Sanz⁴, Alberto Triviño^{1,3}, José M. Ramírez^{1,3*}

1 Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **4** Department of Ophthalmology, School of Medicine, Murcia University, Murcia, Spain

Abstract

In the mouse model of unilateral laser-induced ocular hypertension (OHT) the microglia in both the treated and the normotensive untreated contralateral eye have morphological signs of activation and up-regulation of MHC-II expression in comparison with naïve. In the brain, rod-like microglia align to less-injured neurons in an effort to limit damage. We investigate whether: i) microglial activation is secondary to laser injury or to a higher IOP and; ii) the presence of rod-like microglia is related to OHT. Three groups of mice were used: age-matched control (naïve, n=15); and two lasered: limbal (OHT, n=15); and non-draining portion of the sclera (scleral, n=3). In the lasered animals, treated eyes as well as contralateral eyes were analysed. Retinal whole-mounts were immunostained with antibodies against, Iba-1, NF-200, MHC-II, CD86, CD68 and Ym1. In the scleral group (normal ocular pressure) no microglial signs of activation were found. Similarly to naïve eyes, OHT-eyes and their contralateral eyes had ramified microglia in the nerve-fibre layer related to the blood vessel. However, only eyes with OHT had rod-like microglia that aligned end-to-end, coupling to form trains of multiple cells running parallel to axons in the retinal surface. Rod-like microglia were CD68+ and were related to retinal ganglion cells (RGCs) showing signs of degeneration (NF-200+RGCs). Although MHC-II expression was up-regulated in the microglia of the NFL both in OHT-eyes and their contralateral eyes, no expression of CD86 and Ym1 was detected in ramified or in rod-like microglia. After 15 days of unilateral laser of the limbal and the non-draining portion of the sclera, activated microglia was restricted to OHT-eyes and their contralateral eyes. However, rod-like microglia were restricted to eyes with OHT and degenerated NF-200+RGCs and were absent from their contralateral eyes. Thus, rod-like microglia seem be related to the neurodegeneration associated with HTO.

Citation: de Hoz R, Gallego BI, Ramírez AI, Rojas B, Salazar JJ, et al. (2013) Rod-Like Microglia Are Restricted to Eyes with Laser-Induced Ocular Hypertension but Absent from the Microglial Changes in the Contralateral Untreated Eye. PLoS ONE 8(12): e83733. doi:10.1371/journal.pone.0083733

Editor: Thomas Langmann, University of Cologne, Germany

Received: May 24, 2013; **Accepted:** November 15, 2013; **Published:** December 18, 2013

Copyright: © 2013 de Hoz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by RETICS ENFERMEDADES OCULARES: "Prevención, detección precoz y tratamiento de la patología ocular prevalente degenerativa y crónica." (Grant RD12/0034/0002 and RD12/0034/0014, ISCIII, Spanish Ministry of Science and Innovation); Grant SAF-2012-38328 (Spanish Ministry of Economy and Innovation); Grant PI10/01496 (ISCIII); and 04446/GERM/07 (Regional Government of Murcia, Fundación Séneca). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ramirez@med.ucm.es

Introduction

Glaucoma is a neurodegenerative disease characterized by axonal degeneration that ends with the death of retinal ganglion cells (RGC) [1-4]. Ocular hypertension (OHT) is the major risk factor for glaucoma, [5-7]. Currently, glaucoma is considered an age-related neurodegeneration and, despite differing in aetiologies, they have many important elements in common, including compartmentalized programs of

degeneration targeting axons, dendrites, and finally cell bodies [8].

A close spatial relationship has been established between microglia and multiple retinal ganglion cell (RGC) compartments prior to onset of neurodegeneration [9]. Microglia cells are considered the immunocompetent cells of the CNS. Microglia typically respond to cell damage and degeneration with migration, proliferation, morphological, and immuno-phenotypic changes, as well as production of inflammatory cytokines [10-13]. Indeed, they serve as a

neuropathology sensor [14–17] in the brain and are neuroprotective. However, an uncontrolled microglia response may be dangerous to the survival of injured neurons or can even damage healthy neurons afflicted by excessive inflammation [18]. It has also been suggested that cytokines or other factors regulate morphological, as well as functional changes to all three forms of microglia: activated amoeboid, ramified resting microglia, and proliferating rod-like shaped [19]. Rod-like microglial cells are defined by elongated cell bodies with processes that prominently project from the basal and apical ends. It has been hypothesised that these cells participate in neuronal circuit reorganization [20,21]. It is therefore plausible to suggest that rod-like microglia align to either less-injured neurons or axotomized axons in an effort to limit damage. Alternatively, trains of rod-like microglia could just as easily protect uninjured axons [22]. These activated microglia can degrade the extracellular matrix, promote the retraction of dystrophic axons and destabilize synapses [21,23] in a phenomenon called “synaptic stripping” [24,25]. In glaucomatous disease, RGC synapse elimination is involved early in disease progression [26,27]. In addition, in glaucoma, microglia proliferation occurs together with the upregulation of various inflammatory molecules including TNF- α and TGF- β 1 [28].

It is widely accepted that activated microglia exert dual functions, which are pro-inflammatory and anti-inflammatory functions. The status of these cells is probably on a continuum between these two extreme states [29]. Unilateral injury to one eye may lead to a microglial response in the eye contralateral to the lesion [30,31]. Previously, our group has studied the qualitative and quantitative changes as well as up-regulation of MHC-II expression on the retinal macroglia and microglia in the contralateral eye of adult Swiss mice after 15 days of unilateral laser-induced OHT [32]. Such changes appeared to take place without a decrease in RGC number [33] or presence of NF-200+RGCs (sign of RGC degeneration) [32].

The aim of the present work was to analyse in a model of unilateral laser-induced OHT if: i) microglial activation is secondary to the laser injury or to the rise in IOP; ii) activated microglial cells serve different functions, helping to damage or preserve the RGC in OHT-eyes and contralateral eyes, respectively; and iii) rod-like microglial cells were restricted to eyes with OHT and degenerated NF-200+RGCs and/or absent from their contralateral eyes.

Materials and Methods

Ethics Statement

Mice were treated in accordance with the Spanish Laws and the Guidelines for Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Murcia University and the Animal Health Service of the Murcia Regional Ministry of Agriculture and Water; approval ID numbers: A1310110807. Also, animal manipulations followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research, and the ARVO (Association for Research in Vision and

Ophthalmology) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research.

Animals and anaesthetics

The experiments were performed on adult male albino Swiss mice (40–45 g) obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain). The animals were housed in temperature- and light-controlled rooms with a 12-h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Light intensity within the cages ranged from 9 to 24 lux. Animal manipulation followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research, and the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and was approved by the ethical committee of Murcia University. All surgical procedures were performed under general anaesthesia induced with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of Ketamine (75 mg/kg, Ketalar®, Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and Xylazine (10 mg/kg, Rompún®, Bayer, S.A., Barcelona, Spain). During recovery from anaesthesia, mice were placed in their cages, and an ointment containing tobramycin (Tobrex®, Alcon S.A., Barcelona, Spain) was applied on the cornea to prevent corneal desiccation and infection. Additional measures were taken to minimize discomfort and pain after surgery. The animals were killed with an i.p. overdose of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol®, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).

Experimental groups

Three groups of mice were considered for study: an age-matched control (naïve, $n=15$) and two lasered groups, depending on the region of the eye treated: limbal (OHT group, $n=15$) and non-draining portion of the sclera, (scleral, $n=3$); the two latter were processed 2 weeks after laser treatment.

Laser treatment and IOP measurements

To induce OHT, the left eyes of anaesthetized mice were treated in a single session with a series of diode laser burns (Viridis Ophthalmic following previously described methods that are standard in our laboratories [33,34]. Photocoagulator-532 nm, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France). In brief, the laser beam was directly delivered without any lenses, aimed at the limbal and episcleral veins.

In addition, to ascertain whether the changes observed in microglia were due to the IOP rise or to the inflammatory effects of laser treatment, we studied a scleral group. In this group the laser beam was directly delivered without any lenses, aimed at the non-draining portion of the sclera, specifically 1.2 mm posterior to the limbus of the left eyes to avoid the aqueous-collecting system. In both the limbal- and scleral-treated animal, the spot size, duration, and power were 50–100 μ m, 0.5 s, and 0.3 W, respectively. Each eye received between 55–76 burns.

The IOP of the mice was measured under deep anaesthesia in both eyes with a rebound tonometer (Tono-Lab, Tiolat, OY, Helsinki, Finland) [35,36] prior to as well as 24–48 h and 1 week after laser treatment for the lasered group and before being killed for the naïve. At each time point, 36 consecutive

readings were made for each eye and averaged. To avoid fluctuations of the IOP due to the circadian rhythm in albino Swiss mice [37] due to the elevation of the IOP itself [38], we tested the IOP consistently around the same time, preferentially in the morning and directly after deep anaesthesia in all animals (lasered group and naïve). Moreover, because general anaesthesia lowers the IOP in the mouse, we measured the IOP of the treated eye (OHT-eye) as well as the contralateral intact fellow eye in all the experiments.

Immunohistochemistry

The mice were deeply anaesthetized, perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). The orientation of each eye was carefully maintained with a suture placed on the superior pole immediately after deep anaesthesia and before perfusion fixation. Moreover, upon dissection of the eye, the insertion of the rectus muscle and the nasal caruncle were used as additional landmarks [39]. The eyes were post-fixed for 2h in the same fixative and kept in sterile 0.1 M PB. Retinas were then dissected and processed as retinal whole-mounts [40].

For the analysis of the microglia population of the NFL and for the determination of the relationship between astrocytes and microglia and the expression of MHC class II, retinal whole-mounts from naïve (n=3), OHT-eyes (n=3) and their contralateral eyes (n=3), scleral group (n=3) and their contralateral eyes (n=3), were triple immunostained, as described elsewhere [32], with the following primary antibodies: rabbit anti Iba-1 (Wako, Osaka, Japan) in a 1/500 dilution, chicken anti-GFAP (Millipore, USA) in a 1/100 dilution and anti-mouse MHC class II (I-A/I-E) (eBioscience; San Diego, CA; USA) in a 1/100 dilution. Binding sites of the primary antibodies were visualized with the corresponding secondary antibodies: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/800, DyLight 405-conjugated donkey anti-chicken (Jackson Immuno Research, USA) diluted 1/150 and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/150.

Retinas of naïve (n=3), OHT-eye (n=3) and their contralateral eyes (n=3) were double immunostained with anti-Iba1 plus anti-CD68 (which recognizes a single-chain heavily glycosylated protein of 90-110 kD that is expressed on the lysosomal membrane of macrophages) in order to study the expression of this marker on retinal microglia. The working dilutions were 1/500 for rabbit anti Iba-1 (Wako, Osaka, Japan) and 1/40 for CD68 rat anti-mouse (AbD Serotec, Oxford, UK). Binding sites of the primary antibodies were visualized after two days of incubation with the corresponding secondary antibodies: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/800 and goat anti-rat Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/150.

Retinas of naïve (n=3), OHT-eye (n=3) and their contralateral eyes (n=3) were double immunostained with anti-Iba1 plus, anti-CD86 (that recognize a co-stimulatory molecule). The working dilutions were 1/500 for rabbit anti-Iba-1 (Wako, Osaka, Japan) and 1/25 for rat anti-mouse CD86 (BD Pharmingen Europe). Binding sites of the primary antibodies were visualized after two days of incubation with the

corresponding secondary antibodies: Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/800 and Donkey anti-rat Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/300.

For the study of the expression of Ym1 (which recognizes a protein from the lectin family synthesised and secreted by alternatively activated macrophages during inflammation) on retinal microglia, retinas of naïve (n=3), and OHT-eye, (n=3), and their contralateral eyes (n=3) were double immunostained with anti-MHC class II plus anti-Ym1. The working dilutions were: anti-mouse MHC class II (I-A/I-E) (eBioscience, San Diego, CA, USA) in a 1/100 dilution and rabbit anti-Ym1 (StemCell Technologies, France) in a 1/75 dilution. Binding sites of the primary antibodies were visualized after two days of incubation with the corresponding secondary antibodies: goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/150 and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/800. To study the relationship between dendrites, axons, and microglia, we double immunostained the retinal whole-mounts of naïve eyes (n=3), OHT-eye (n=3) and their contralateral eyes (n=3), with the following primary antibodies: rabbit anti Iba-1 (Wako, Osaka, Japan) in a 1/500 dilution and mouse anti-NF-200 (a marker of axonal cytoskeleton, that accumulates abnormally in the soma and dendrites of the RGCs after axonal injury) (Sigma St Louis, MO, USA) in a 1/500 dilution. Binding sites of the primary antibodies were visualized after two days of incubation with the corresponding secondary antibodies: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/800 and goat anti-mouse Alexa Fluor 405 (Invitrogen, Paisley, UK) diluted 1/100.

In all instances, a negative control was performed to demonstrate that the secondary antibody reacted only with their respective primary antibody. This control was made by eliminating primary antibody and replacing it with antibody diluent. In addition to identifying the contribution of the endogenous fluorescence to the observed label, a tissue sample was incubated in all the buffers and detergents used in the experiment but without antibodies [40].

Retinas were analysed and photographed with the ApoTome device (Carl Zeiss, Germany) coupled to a fluorescence microscope (Zeiss, *Axioplan 2 Imaging Microscope*) equipped with appropriate filters for fluorescence-emission spectra of Alexa fluor 488 (Filter set 10, Zeiss), Alexa fluor 594 (Filter set 64, Zeiss) and DyLight 405 (Filter set 49, Zeiss). The ApoTome uses the "structured-illumination" method that enables conventional microscopy to create optical sections through the specimen and thereby improve the contrast and resolution along the optical axis.

Statistical Analysis

Data for the statistical analysis were introduced and processed in a SPSS 19.0 (comprehensive statistical software; SPSS Inc®). Data are shown as mean±SD. Statistical analyses were performed to compare IOP values of the OHT-eyes, the contralateral and naïve eyes.

Results

1: OHT group

Laser-induced ocular hypertension. The IOP values of OHT-eyes (29.55 ± 4.44 mmHg) significantly differed from naïve values (16.16 ± 3.11 mmHg; $P < 0.001$, ANOVA with Bonferroni) and contralateral eyes (15.47 ± 1.57 mmHg; $P < 0.001$, ANOVA with Bonferroni). No significant differences were found between contralateral and naïve eyes.

Iba-1 immunostaining. In the naïve and contralateral eyes, Iba-1+ cells were distributed in a mosaic of tiled cells that built networks throughout the entire retina (Figure 1). Most microglia in the NFL exhibited a ramified morphology. They were associated with the retinal vessels and their somas were located on or near the vessel walls (Figure 2). In addition, both in the large retinal vessels (in the vicinity of the optic nerve) and in the collecting tube (in the peripheral retina) of naïve and contralateral eyes, some perivascular Iba-1 positive cells displayed bipolar morphology (Figure 3A,B). Notably, in addition to these two morphological cell types, in the NFL of OHT-eyes, there were Iba-1+ cells with a rod-like morphology (elongated cell bodies and two processes prominently projected from each pole) (Figure 2C). These cells did not relate to retinal vessels and aligned end-to-end, coupling to form trains. We use the term “coupling” to indicate a physical proximity between the processes of adjacent rod-like microglia (Figure 1C; Figure 2C1,C3, F1,F3). These trains consisted of multiple cells running parallel to the retinal surface from the optic disc to the periphery. The trains were more evident in the central area than in the intermediate one (Figure 1C; Figure 2C1,C3), and mostly absent in the retinal periphery (Figure 2F1,F3).

In the trains, rod-like microglia in the NFL of eyes with OHT related to each other in three different ways. First, process to process: the process of one rod-like microglia seemingly intertwined with the process of the next rod-like microglia in the train (Figure 4A). Second, process to cell body: the process of one rod-like microglia seemed to surround the cell body of the next rod-like microglia in the train (Figure 4B). Third, cell body to cell body: the two cell bodies were in apparently close contact (Figure 4C).

Some processes of rod-microglia penetrate the underlying ganglion-cell layer and inner plexiform layer, as observed both using the z-stack tool associated with Zeiss, Axioplan 2 Imaging Microscope as well as on one edge of the tissue due to the retinal-like section effect caused by the pressure exerted by the cover slip on the whole-mount (Figure 5).

Staining of rod-like microglia with markers for activated microglia: MHC-II, CD68, CD86, CD163 and Ym1. A weak constitutive MHC-II expression was found in some microglial cells in the NFL in naïve eyes (Figure 3A2). By contrast, in contralateral eyes 15 days after laser-induced OHT, Iba-1+ microglia exhibited intense MHC-II immunoreaction (Figure 3B2). In some instances, in the contralateral eyes, some Iba-1+ dystrophic microglia had intense CD68 immunostaining. No CD86 (Figure 6B2) or Ym1 immunostaining (Figure 6D2) was observed in microglial cells in contralateral eyes.

Fifteen days after lasering, rod-like microglia were detected in OHT-eyes. These rod-like microglia had an intense MHC-II+ immunoreaction (Figure 3C2; Figure 4A2,B2,C2) and a punctate CD68 staining throughout the NFL (Figure 7). This staining was evident in rod-like microglia throughout the train, both in the cytoplasm and in the processes. In addition, three stages of rod-like microglia were observed to coexist in OHT eyes. These stages could represent different activation phases considering morphological features as well as CD68 immunostaining patterns: i) an initial stage in which rod-like microglia had elongated cell bodies and processes prominently projected from the poles. These cells had an intense CD68 punctate staining (Figure 7A1-A3); ii) a second stage of cells with shorter and thicker processes and coarse patches of CD68 immunoreaction (Figure 7B1-B3); and iii) a third stage with thick fusiform cell bodies, short and thick bipolar processes and intense CD68 positive cytoplasm (Figure 7C1-C3). In all instances, CD68 immunoreaction was detected both in the cytoplasm and processes.

In the NFL of OHT-eyes no CD86 (Figure 6A1-A3) or Ym1 (Figure 6C1-C3) expression was detected in ramified or rod-like microglia. Positive immunostaining for these markers was found only in scarce globular cells located in the NFL and vitreal surface of the retina (Figure 6A2,C2 inset).

Rod-like microglia, astrocytes, and axons. We performed a double-labelling with Iba-1 and GFAP to study micro- and macroglial cells, respectively. GFAP immunostaining revealed that after 15 days of laser-induced OHT [32] macroglia showed reactivity features and that rod-like microglia and astrocytes were apparently not related to each other (Figure 2).

A double-immunostaining with Iba-1 and NF-200 was performed to study the relationships between rod-like microglia and RGC after axonal injury. In naïve and contralateral eyes RGC axons were uniformly labelled with anti-NF-200 (Figure 8A-B). NF-200+RGC staining was rarely observed in the somas or dendrites of RGCs [32]. In these eyes the ramified microglia were associated with blood vessels (Figure 2A,B,D,E) and sent some processes to the axons (Figure 8A,B).

OHT eyes showed an abnormal NF-200 accumulation both in RGC axons as well as in the cell bodies and primary dendrites of some RGCs [32] (Figures 5B2,B3; 9A2,B2,C2). The rod-like microglia trains in OHT eyes were associated with axons (Figure 8C) and not related to retinal vessels (Figure 2C,F). Rod-like microglia were observed parallel to and close to axons, with minimal gaps between the two (Figure 8C; Figure 9A2,B2,C2). Apparently some processes of rod-like microglia were in close contact with NF-200+RGC bodies and dendrites (Figure 5B1-B3; Figure 9). It bears mentioning that in some instances rod-microglia deviated from being completely parallel to the axon and, with its processes, surrounded the soma and proximal dendrites of NF-200+RGCs (Figure 9A2,B2,C2). In the retinal-like section effect produced by the pressure exerted by the cover slip on the whole-mount, we observed that rod-microglia processes were related to the dendrites of NF-200+RGCs in the IPL (Figure 5B1-B3).

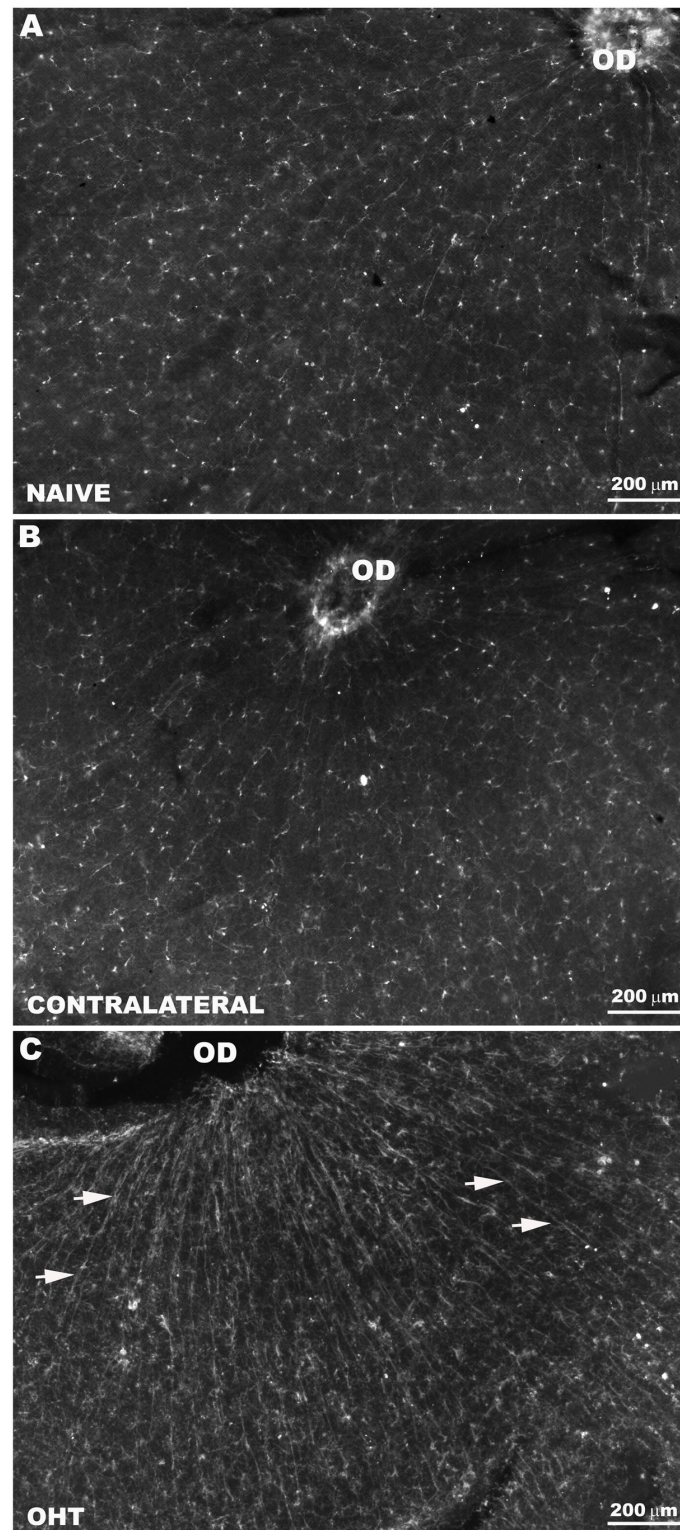


Figure 1. Rod-like microglia were restricted to the NFL of OHT-eyes. Iba-1+ cells in the NFL and RGC layer. Retinal whole-mounts. In naïve (A) and contralateral (B) eyes, Iba-1+ cells were distributed in a mosaic of tiled cells that built networks throughout the entire retina. In OHT-eyes (C), Iba-1+ cells aligned forming parallel trains (arrows) composed by multiple cells exhibiting rod-like morphology. The trains were more evident in the central retina. (NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; OD: optic disc; OHT: ocular hypertension).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g001

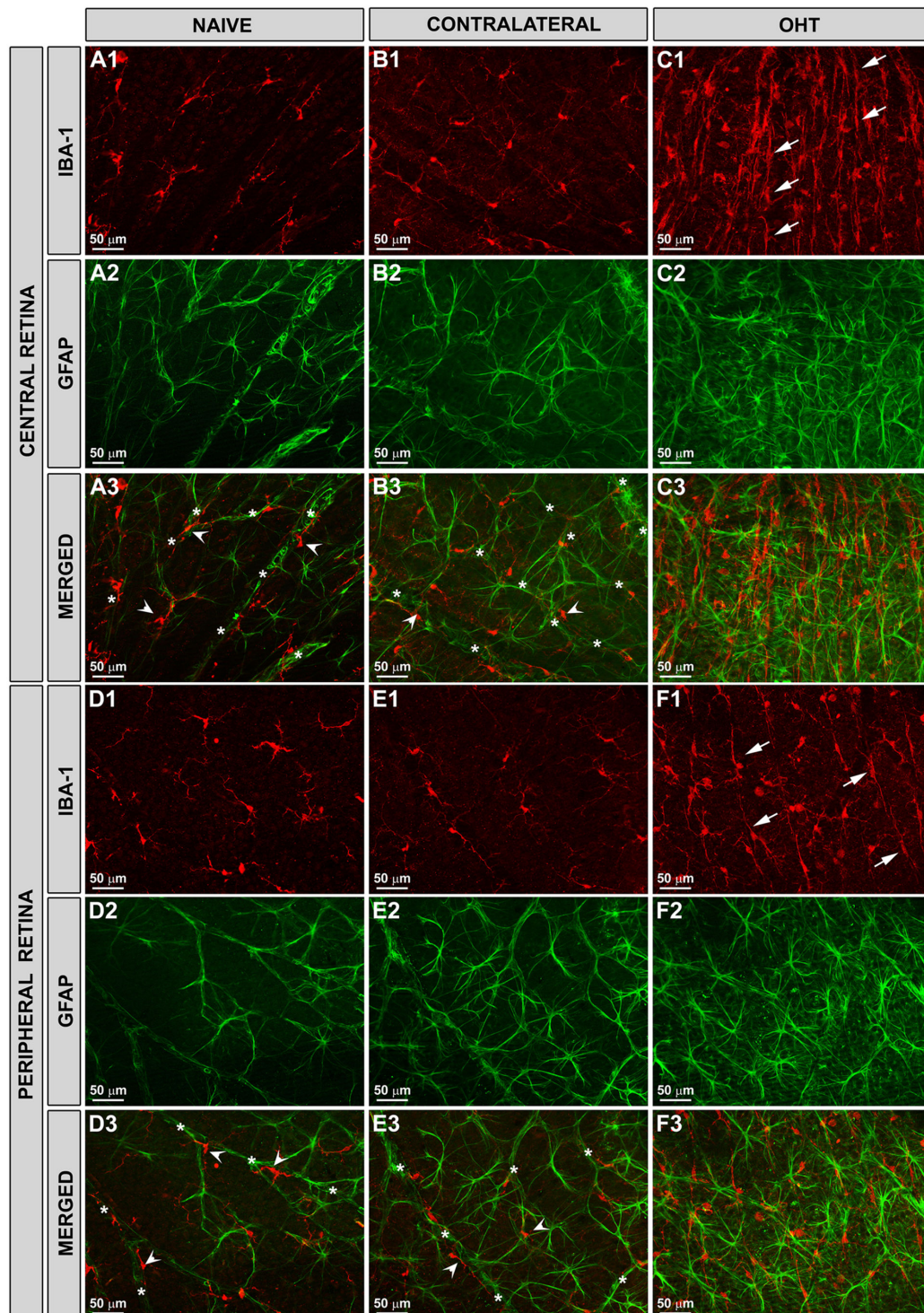


Figure 2. Rod-like microglia did not relate to retinal blood vessels or astrocytes. Iba-1+ and GFAP+ cells in the NFL and RGC layer. Retinal whole-mounts. In naïve (A,D) and contralateral (B,E) eyes, most Iba-1+ cells had a ramified morphology (A1, B1, D1, E1: arrowhead) and their somas were located on or near the vessel walls (A3, B3, D3, E3: asterisks). GFAP+ astrocytes were located among ramified Iba-1+ cells and like these, were related to the vessels (A2-A3, B2-B3, D2-D3, E2-E3). In OHT-eyes (C,F), astrocytes and Müller cells were reactive (C2-C3, F2-F3). No alignment or co-localization of GFAP+ astrocytes with rod-microglia (C1, F1: arrows) was detected. Trains of rod-like microglia were more evident in the central (C1, C3) than in the peripheral retina (F1, F3). (NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; OHT: ocular hypertension). .

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g002

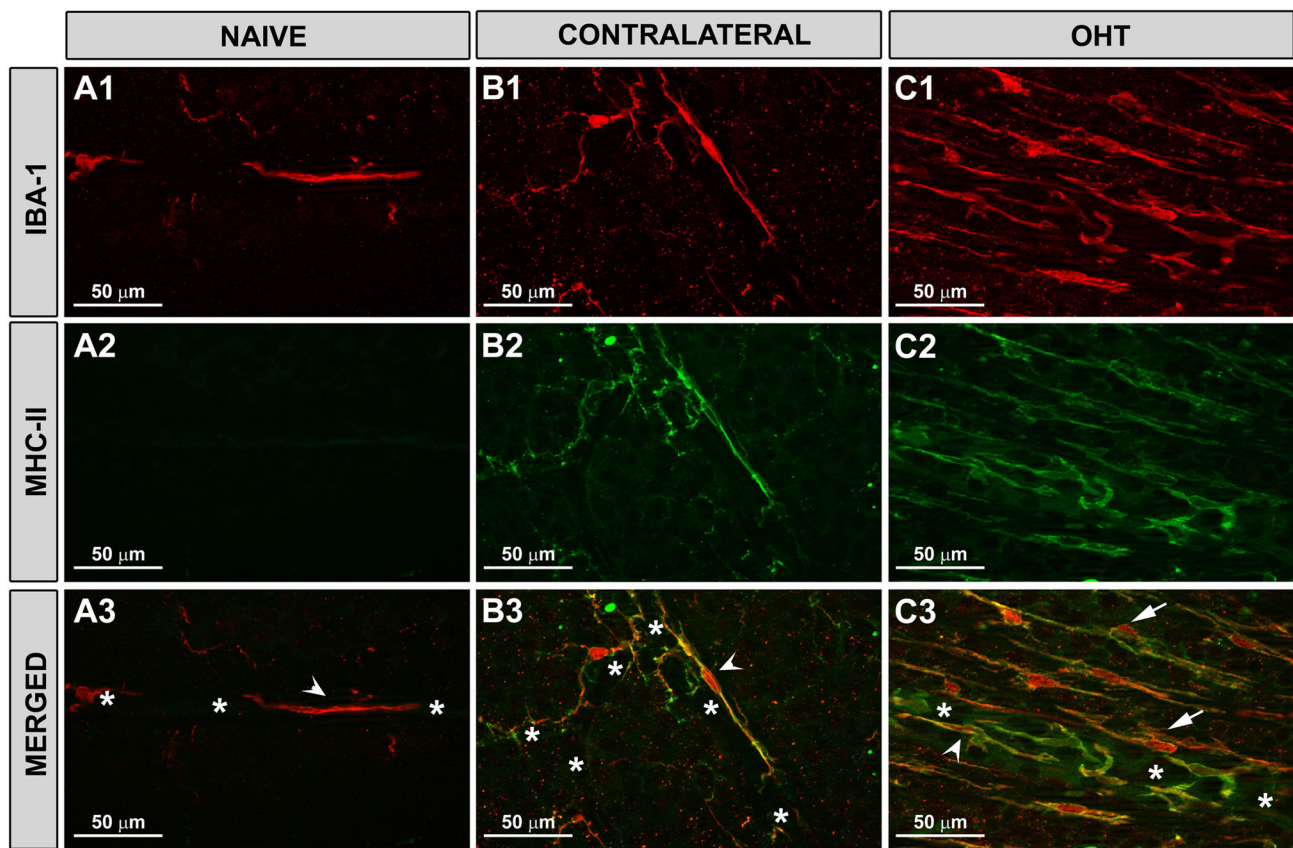


Figure 3. MHC-II was upregulated in contralateral and OHT-eyes. Iba-1+ and MHC-II+ cells in the NFL and RGC layer. Retinal whole-mounts. In naïve (A1-A3), contralateral (B1-B3), and OHT (C1-C3) eyes, some Iba-1+ cells displayed bipolar morphology and perivascular arrangement (arrowhead). These cells were observed mainly in the large retinal vessels (in the vicinity of the optic nerve) and in the collecting tube (in the peripheral retina) and expressed MHC-II. This MHC-II expression, constitutive in naïve eyes (A2-A3), was upregulated in contralateral (B2-B3) and OHT-eyes (C2-C3). (NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; OHT: ocular hypertension; asterisk: blood vessel; arrow: rod-microglia).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g003

2: Scleral group

The IOP values of eyes that received laser in the sclera (15.69 ± 0.12 mmHg) did not present significant differences with their contralateral (15.94 ± 0.02 mmHg) eyes and naïve eyes (16.16 ± 3.11 mmHg). Similarly to naïve lasered as well as contralateral eyes in the scleral group had ramified Iba-1+ cells in the NFL distributed in a mosaic of tiled cells that built networks throughout the entire retina (Figure 10) and exhibited a weak constitutive MHC-II expression (Figure 11A3). No rod-like microglia were detected in the NFL of this group of animals (Figures 10, 11A1,B1).

MHC-II expression was upregulated in Müller cells and some astrocytes. No differences in terms of MHC-II expression by the macroglia were found between treated and untreated fellow eyes (Figure 11A2-4,B2-4).

Discussion

It has been reported that in the experimental model of OHT used in this work, 15 days after laser treatment the microglia of untreated as well as OHT-eyes had signs of activation [32]. However, two main issues remain unknown: i) whether microglial activation is secondary to laser injury or higher IOP; and ii) if microglial activation is IOP related, whether or not these activated cells could be exerting different functions contributing to damage or preservation of the RGC in the OHT-eyes and contralateral normotensive eyes, respectively. Therefore the present study was focused on evaluating the contribution of laser injury and IOP to the microglial activation observed in the NFL and on analysing the differential behaviour of activated microglial cells in this retinal layer after 15 days of laser treatment.

In the model of laser-induced OHT used in the present work, a substantial increase in the IOP was evident 24 h after laser treatment of limbal and episcleral veins. This continued for 4 days

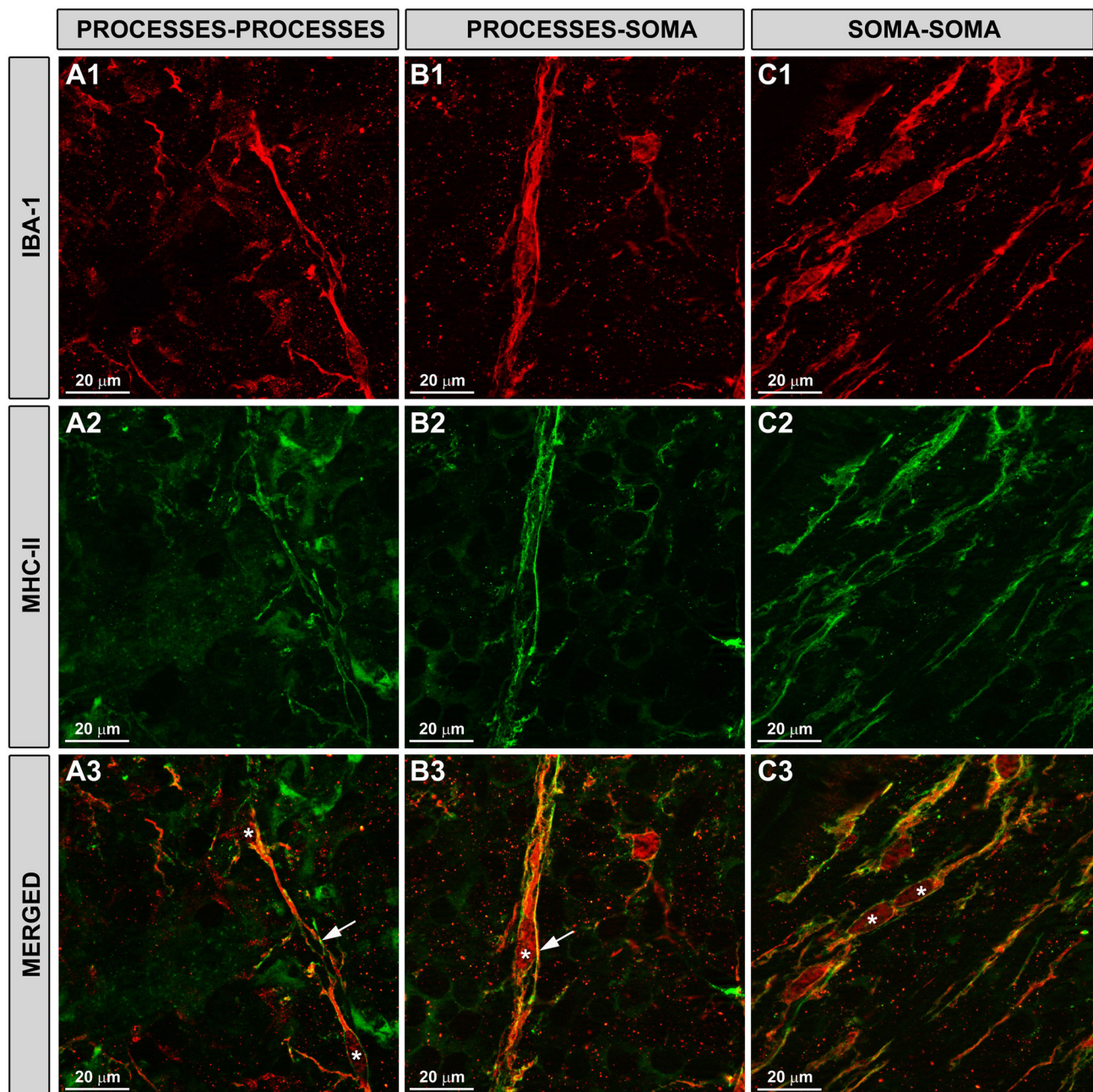


Figure 4. Rod-like microglia expressed MHC-II and related to each other in three different patterns. Iba-1+ and MHC-II+ cells in the NFL and RGC layer. Retinal whole-mounts. Rod-like microglia expressed MHC-II (A2-A3, B2-B3, C2-C3). In the trains, they related to each other in three ways. Process-process (A1-A3): processes of neighbouring rod-microglia in the trains seem to be intertwined; process-soma (B1-B3): the process of one rod-like microglia seems to surround the cell body of the next rod-like microglia in the train; soma-soma (C1-C3): two cells bodies are in apparent close contact. (NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; OHT: ocular hypertension; asterisk: soma; arrow: processes).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g004

and then gradually returned to the basal value after the fifth day, so that by one week after lasering, the IOP values in the treated animals were comparable for both eyes [33].

No morphological signs of activation were detected in the retinal microglia of those animals receiving laser in the non-draining portion of the sclera (the scleral group), in which the IOP values did not differ from control.

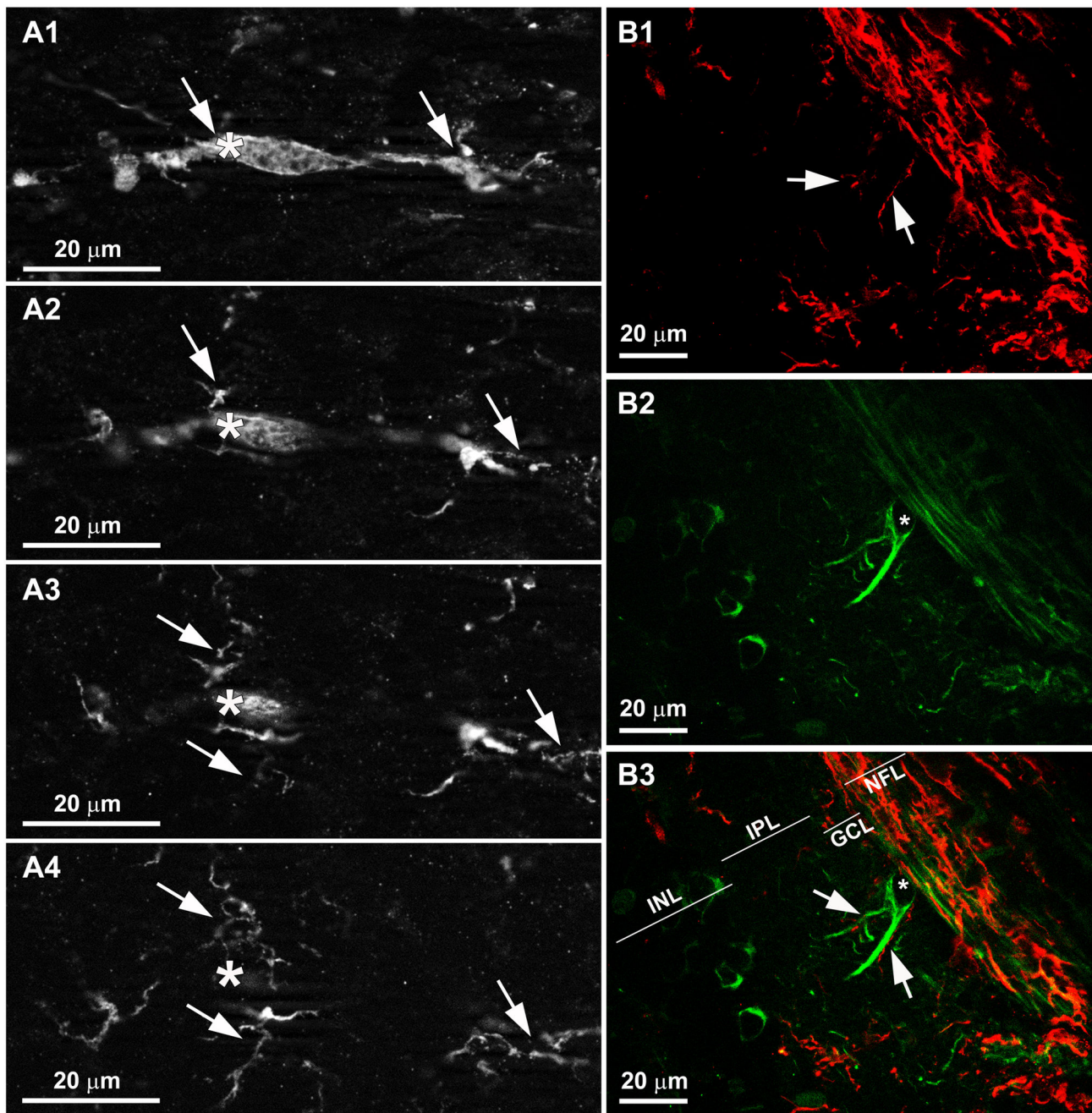


Figure 5. The processes of rod-microglia penetrates the IPL. Iba-1 and NF-200 immunostaining. Retinal whole-mounts. Using the z stack tool associated with the microscope, we observed that some processes of rod-microglia penetrate the ganglion-cell layer and inner plexiform layer (A). The pressure observed by the cover slip on the whole-mount caused retinal-like section effect on one edge of the tissue that revealed that, in the IPL, rod-microglia were apparently in close relation with the dendrites of NF-200+RGCs (B1,B3). (INL: inner plexiform layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion-cell layer; NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; asterisk: soma; arrow: rod-microglia processes).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g005

With respect MHC-II expression by the glial cells of the retina, differences appeared 15 days after lasering, depending on the location of laser application. Only eyes in the OHT group

(treated eyes as well as fellow untreated eyes) had an upregulation of the MHC-II expression by the retinal microglia. With respect the macroglia, MCH-II was upregulated in both

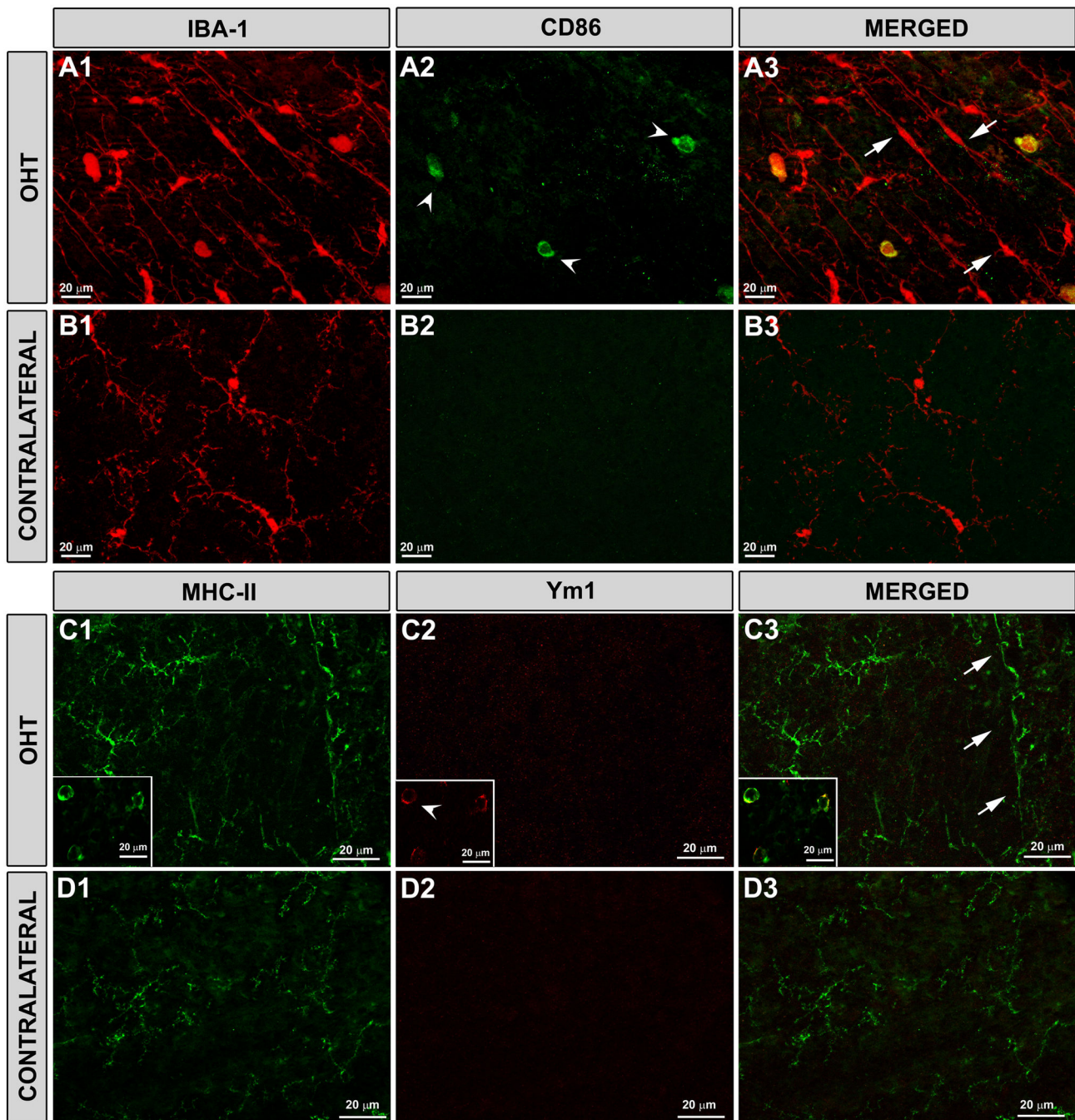


Figure 6. Rod-like microglia did not take either CD86 or Ym1 staining. Iba-1, CD86, MHC-II and Ym1 immunostaining in the NFL. Retinal whole-mounts. In OHT-eyes (A1-A3, C1-C3) CD86 immunostaining (A2, A3) and Ym1 immunostaining (C2-C3: inset) was restricted to few globular cells (arrowhead) located in the NFL and in the vitreal surface of the retina. Rod-like microglia (arrow) did not show either CD86 or Ym1 immunostaining. In contralateral eyes (B1-B3, D1-D3) no CD86+ or Ym1+ cells were detected. (NFL: nerve-fibre layer).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g006

groups of animals receiving laser (OHT and scleral), although there was a difference between them: in the scleral group, where IOP values not differ significantly from naïve eyes, the

upregulation of MHC-II expression by the macroglia was similar in treated eyes and untreated fellow eyes. On the contrary, in the OHT group the upregulation of MHC-II expression was

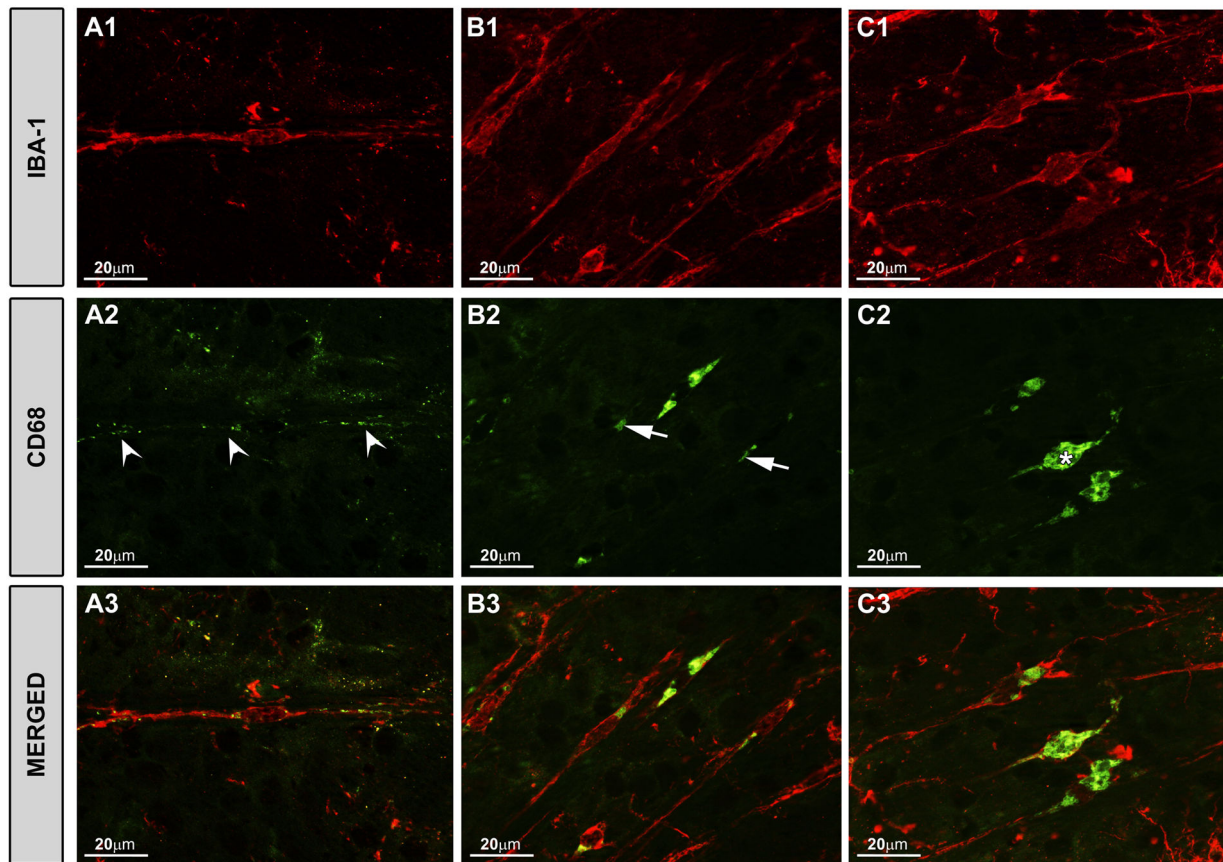


Figure 7. Rod-microglia had different stages of CD68 staining. Iba-1+ and CD68+ cells. Retinal whole-mounts. With respect both to morphological features and to CD68 immunostaining patterns, three stages of rod-like microglia were detected: (A1-A3) rod-like microglia with elongated cell bodies and processes prominently projected from the poles and an intense punctate CD68 staining (arrowhead); (B1-B3) cells with shorter and thicker processes, and coarse patches of CD68 immunoreaction (arrow); (C1-C3) fusiform cell bodies with short and thick bipolar processes and intense CD68 positive cytoplasm (asterisk). In all cases, CD68 immunoreaction was found both in the cytoplasm and processes.

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g007

observed mainly in Müller cells in OHT-eyes and mainly in astrocytes in their fellow normotensive eyes [32]. In view of these results, although the laser injury in the anterior segment of the eye induced some effects on the retinal macroglia, it seems that in this model of laser-induced OHT microglial activation is at least in partly related to the rise in IOP.

It has been reported that in mouse retina, cannulation of the anterior chamber, with and without associated acute elevation of the IOP, trigger MHC-II upregulation in perivascular macrophages and vitreal hyalocytes. This result was not detected in the contralateral fellow eyes 1 week after the rise in IOP [41]. These contradictory findings in comparison with our results could be due to the different mechanisms involved in varying experimental models of elevated IOP.

A reactive microgliosis secondary to neurodegeneration has been reported in axotomy, ischaemia, and acute ocular hypertension [42-51]. In the present study the comparison between OHT-eyes and their contralateral ones revealed that in both eyes, Iba-1+ cells showed signs of activation and

upregulation of the MHC-II expression. However, a relevant difference between treated and untreated eyes was that only OHT-eyes had Iba-1+ cells with rod-like morphology. In addition, rod-like microglial cells were not found in the scleral group. The fact that rod-like microglia was restricted to eyes with OHT lead us to postulate that this cell phenotype is not associated to the laser injury.

Rod-like microglial cells were related to axons but not to retinal blood vessels. Notably, they were apparently more evident in the central than in the intermediate zone of the retina and were scarcely seen in the retinal periphery, where the concentration of axons is reduced [52-54].

It is well known that in the brain rod-like microglia is related to neurodegeneration [55,56]. Accordingly, in this experimental model, the presence of rod-like microglia was restricted to eyes with OHT in which neuronal damage is present [33] but absent in the contralateral untreated eyes where macro- and microglia showed signs of activation but neurodegeneration appears to

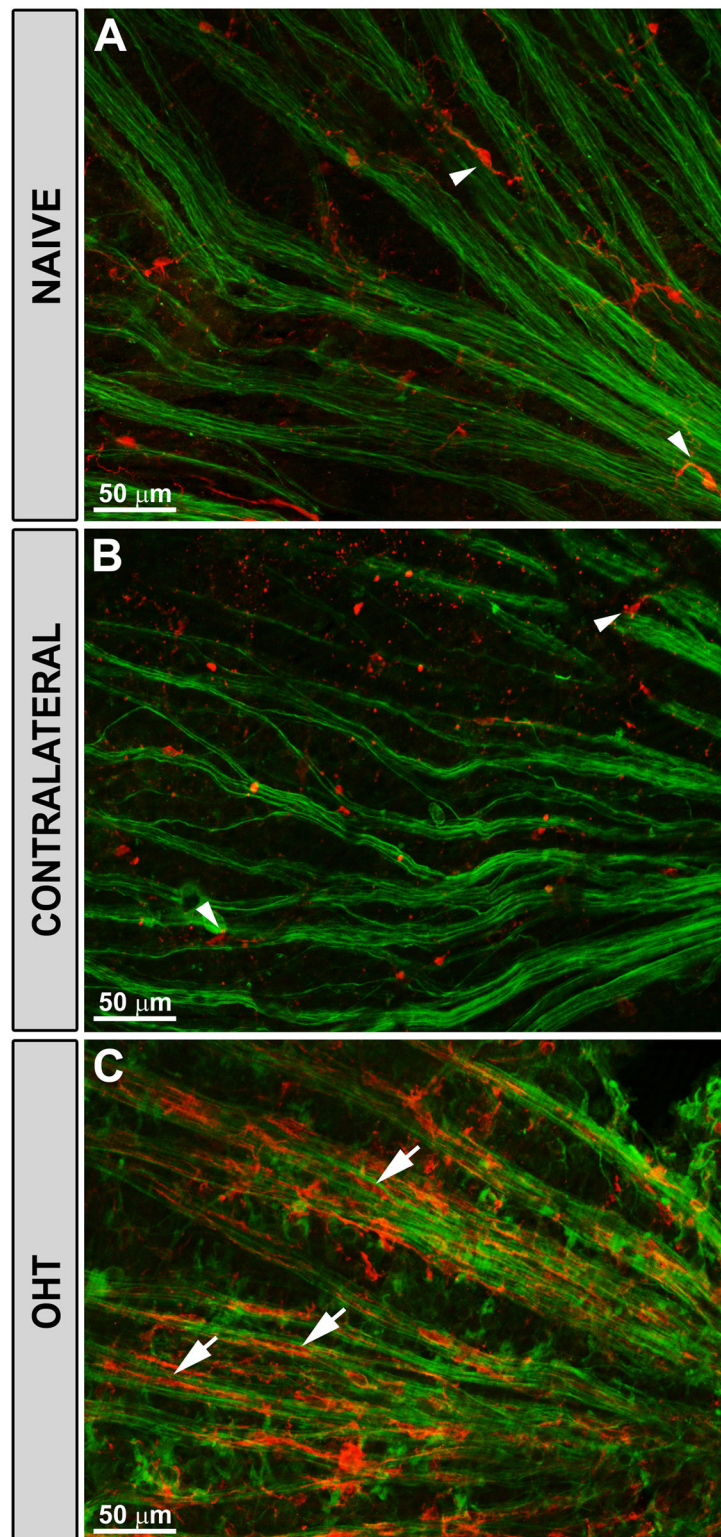


Figure 8. Rod-like microglia was related to axons. Iba-1 and NF-200 immunostaining. Retinal whole-mounts. In naïve (A) and in contralateral eyes (B) the ramified microglia (arrowhead) sent some processes to the axons but did not run parallel to the axons. By contrast, the rod-microglia trains in OHT-eyes (C) run parallel to and close to axons (arrow). (OHT: ocular hypertension).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g008

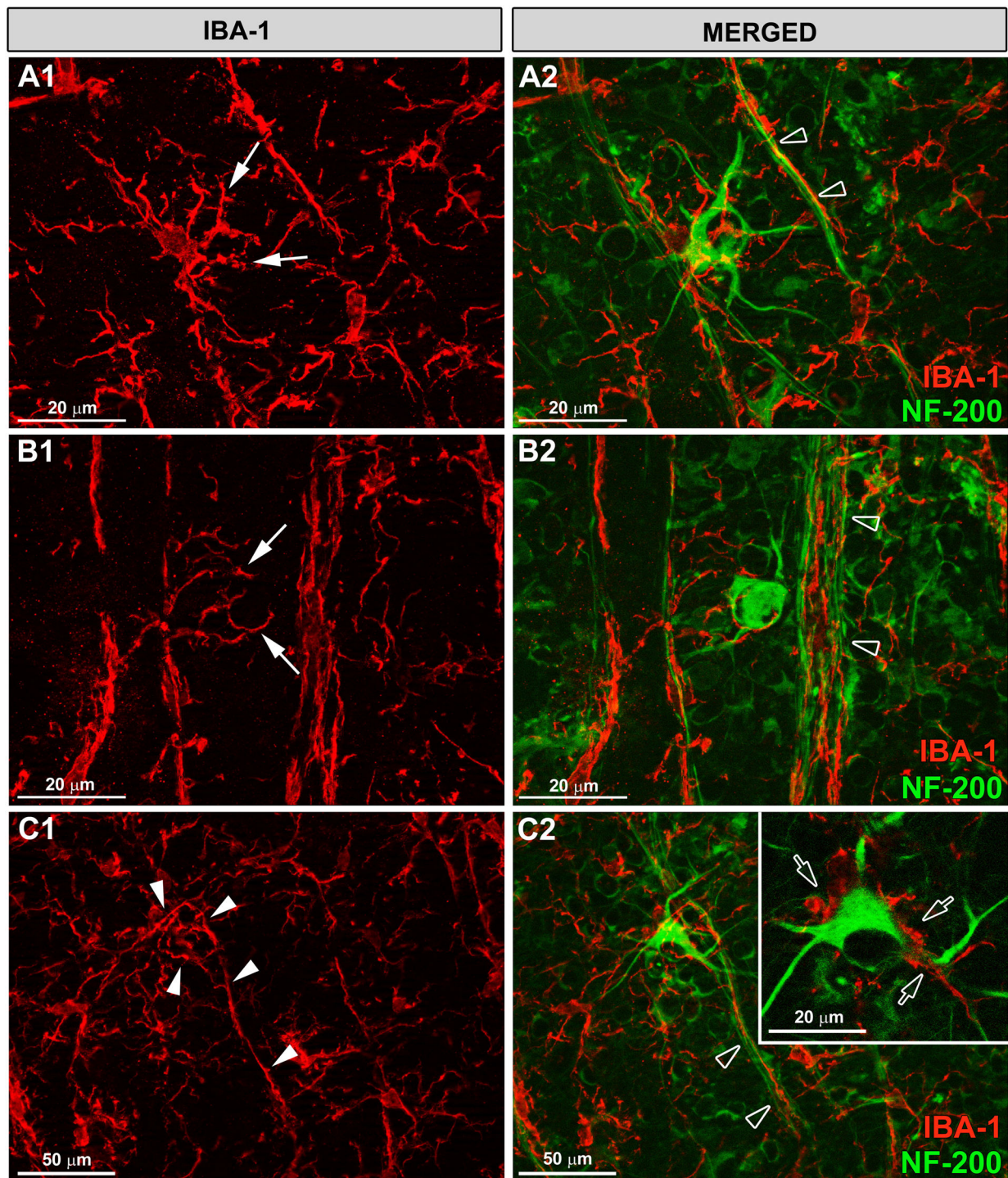


Figure 9. Rod-microglia sent processes to NF-200+RGCs somas and dendrites. Iba-1 and NF-200 immunostaining. Retinal whole-mounts. In OHT-eyes there was an abnormal NF-200 staining of the soma and primary dendrites of some RGCs (A2-C2). Rod-microglial run parallel to and close to axons, with minimal gaps between the two (empty arrowhead). Rod-microglia sent processes to NF-200+RGCs bodies and dendrites (arrows in A1-B2). The processes of the rod-microglia were apparently in close contact with NF-200+RGCs somas and dendrites (empty arrow in inset). In some instances rod-microglia deviates from its straight parallel to the axon and, with its processes, surrounds the soma and proximal dendrites of NF-200+RGCs (arrowhead in C1, C2).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g009

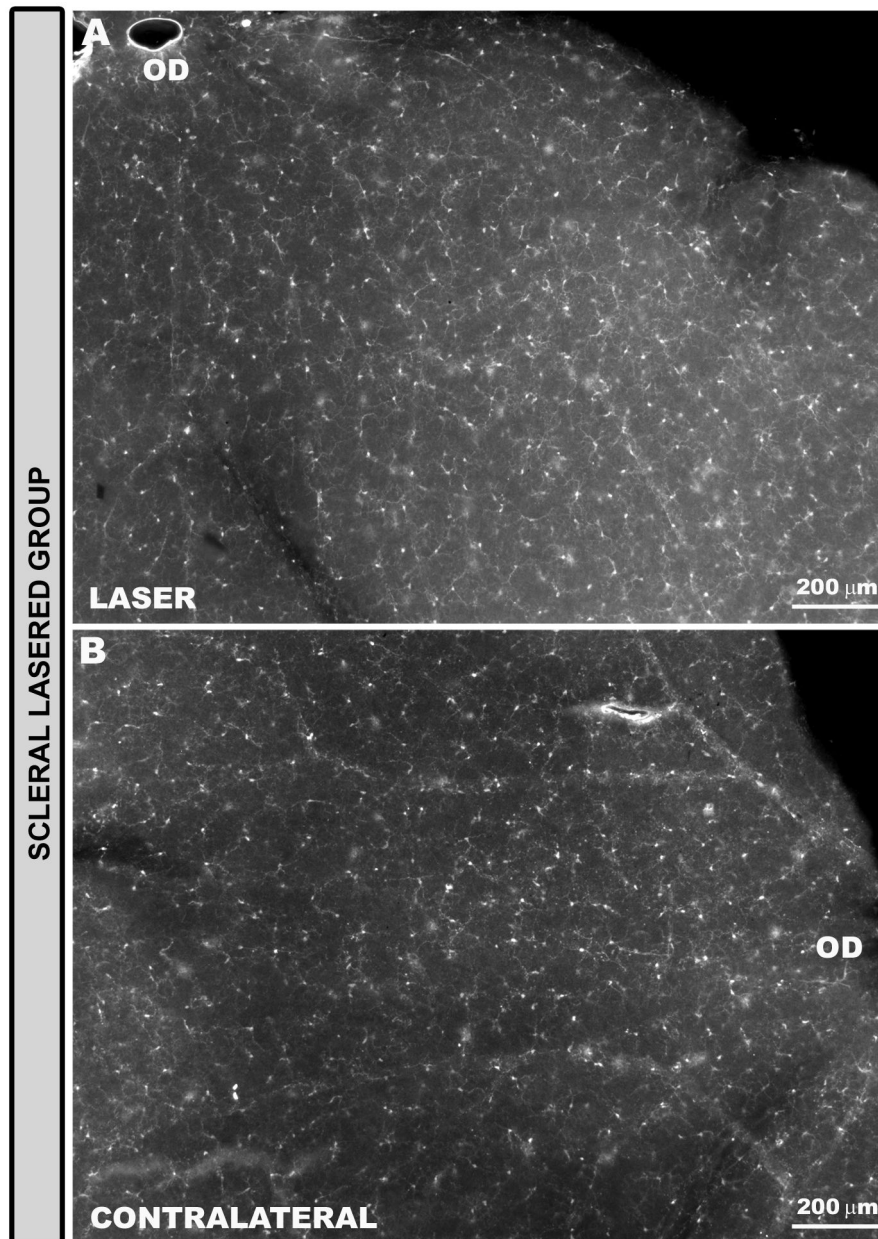


Figure 10. Rod-like microglia were absent in the scleral lasered group of eyes. Iba-1+ cells in the NFL and RGC layer. Retinal whole-mounts. In eyes receiving laser in the non-draining portion of the sclera, lasered (A) as well as contralateral untreated eyes (B) Iba-1+ cells were distributed in a mosaic of tiled cells that built networks throughout the entire retina. No rod-like microglia was detected in the NFL of this group of animals (NFL: nerve-fibre layer; RGC: retinal ganglion-cell layer; OD: optic disc).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g010

be absent [32,33]. This is the first available report of such an observation in ocular hypertension.

The presence of rod-like microglia has been associated mainly with axonal injury [22]. It bears noting that, in the present study, rod-like microglia were related to axons and were in apparent contact with the soma and dendrites of RGCs exhibiting features of degeneration (accumulation of phosphorylated neurofilaments revealed by the NF-200+

staining). A striking feature of this relationship was that a rod-microglia deviated from its straight parallel location to the axon and, with its processes, surrounded the soma and dendrites of NF-200+RGCs. The relationship between rod-like microglia and dendritic degeneration have been reported in the brain during ischaemia [57], after injury to the hypoglossal nerve [58] and during inflammation in the cortex [59]. It seems that the rod-like microglia might be involved in the active removal or

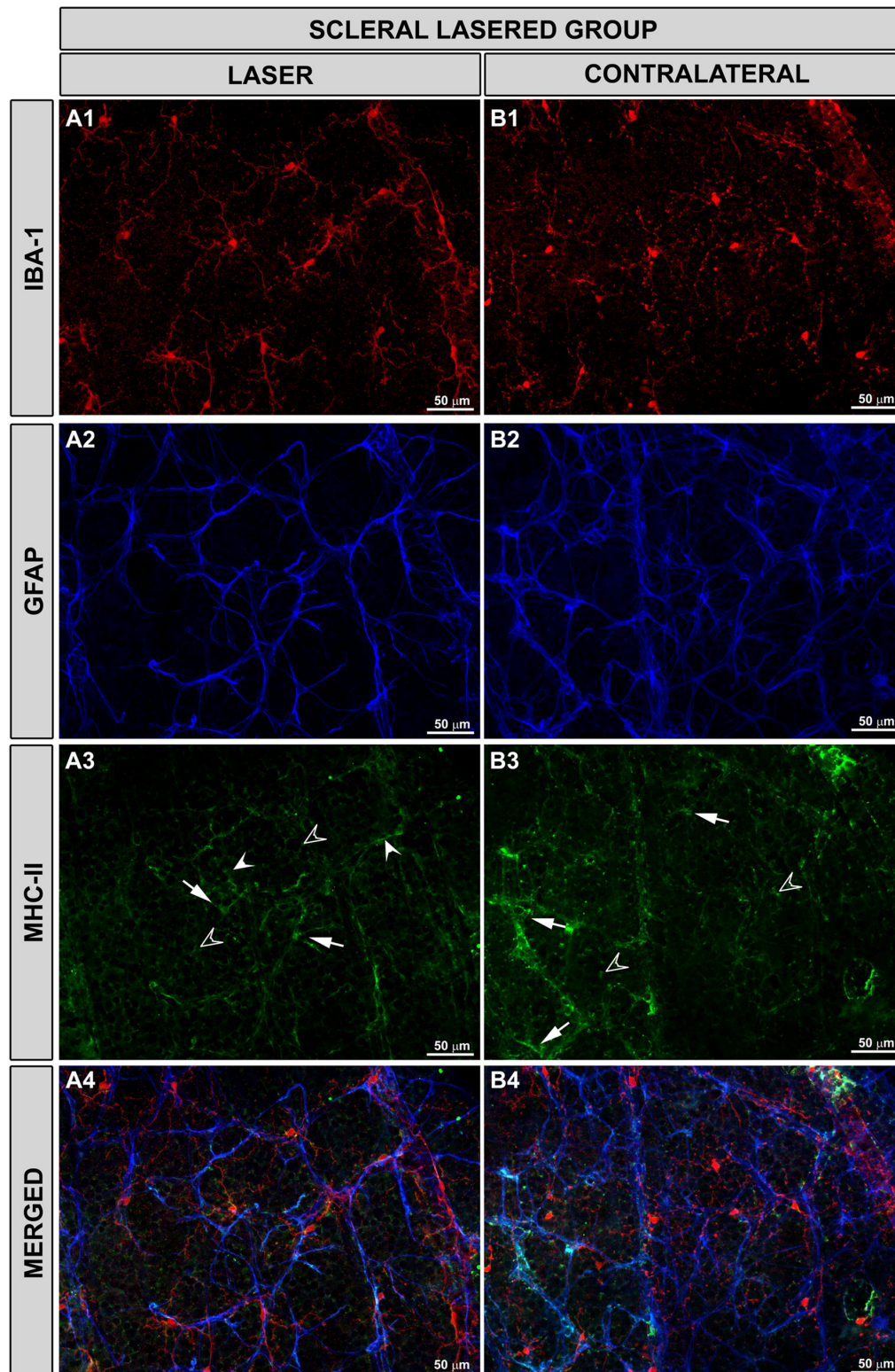


Figure 11. Macroglial MHC-II expression was upregulated in the scleral lasered group of eyes. Iba-1, GFAP and MHC-II immunostaining. Retinal whole-mounts. Both in lasered (A1-A4) and contralateral untreated (B1-B4) eyes, MHC-II expression was upregulated in astrocytes (arrow) and Müller cells (empty arrowhead). Some microglia in the NFL (arrowhead) had a constitutive MHC-II expression. (NFL: nerve-fibre layer).

doi: 10.1371/journal.pone.0083733.g011

“stripping” of these synaptic contacts [21,25]. The fact that rod-like microglia in the present study were positive for CD68, a marker associated to clearance of cells debris [60], could support this statement. Rod-like microglia could also participate in the remodelling of synaptic circuitry disrupted, possibly by tagging some synapses for elimination during prolonged direct contact after ischaemic insult [61]. This capacity could be favoured by the migratory capability of microglia towards vulnerable areas, which could contribute to circuits reorganization clearing degenerating synapses [23,62].

Although MHC-II upregulation in rod-like microglia could make these cells work as potential immunocompetent antigen-presenting cells, the fact that these cells did not express the co-stimulatory molecule CD86 could contribute to downregulating of the immune response [63,64].

Ym1 is a marker expressed by alternatively activated macrophages associated to recovery and function restoration [65,66]. Ym1 is activated transiently in peripheral macrophages and in the CNS, suggesting that it may be involved in the down-regulation of inflammation by competing leukocyte trafficking for binding sites on local extracellular matrix [67]. According to what has been reported in the brain ischaemic injury in mice [60], this transient activation could be the reason for observing Ym1 positivity in only a few globular cells 15 days after unilateral laser-induced OHT.

Some of the characteristics of the rod-like microglia observed herein, such as morphological features, their relationship with axons but not with blood vessels, or their expression of known activation markers (MHC-II, CD68) coincide with those reported under many neuropathological and experimental conditions including stroke, Alzheimer's disease, and encephalitis [22]. It has been proposed that the preserved neuronal tissue after a diffuse insult is critical for the formation of rod-like microglial cells [12,13,68]; with extensive cellular damage or necrosis, only phagocytic microglia can be found.

The capacity of the microglia to adopt a bidirectional orientation from progressing to regressing stages has been recently reported. Using histological criteria, this process has been divided into 6 stages of activation and deactivation [69]. According to this classification, rod-like microglia in the NFL of OHT-eyes would be in phase 5A, which corresponds to Iba-1+ and CD68+ cells. In addition, more advanced stages were also observed in our study. These were characterized by more intense CD68 immunostaining, shorter processes, and rounder somas.

With respect to the relationships that rod-like microglia establish between each other when forming trains, it is worth underlining what we described these as soma-soma, which consisted of two somas of neighbouring cells in apparently close contact. This situation could correspond to microglial cells in division, as revealed by BrdU studies in which both nuclei of the cells in contact were labelled [69,70]. It has been reported that at more advanced stages of activation the presence of cells with multiple nuclei could be the result of microglial cells fusing with each other [69]. The clustering reported by others [71] could be a precursor stage for the eventual fusing of the cells [69]. It has been suggested that cytokines and other factors induce multinucleated giant cells

[72] and regulate morphological, as well as functional, changes to all three forms of microglia; activated amoeboid, proliferating rod-shaped, and ramified resting microglia [70].

Although laser treatment induced changes in the retina of contralateral eyes independently of the location of laser application, the characteristic of this reaction varied depending on whether or not there was a rise in IOP in the treated eye. In all instances, laser treatment induced a macroglial reaction but only in eyes contralateral to OHT was the microglia involved.

There are other instances of contralateral effects after unilateral eye injury [30,73,74]. It has been suggested that multiple cell responses in the contralateral eye could be due to the crossing fibres at the optic chiasma or some retino-retinal fibres present in rodents [30]. The fact that the microglia showed an immediate and clear pattern of activation within the contralateral ON and retina, lead some authors suggest haematic involvement in transferring information to the contralateral eye [30]. Among the possible mechanisms participating in the glial changes observed in the contralateral normotensive eye is the immune response [75]. Immune-related data in patients with glaucoma [76] and the capacity of the optic nerve glia to express HLA-DR molecules [73] support this hypothesis. Another potential explanation would be that changes in the contralateral eye are part of a general activation due to the sensitivity of microglia to any inflicted injury to the nervous system [74]. It is now well accepted that neurogenic mechanisms contribute to the symmetrical spread of inflammation in rheumatoid arthritis [77,78] and that transneuronal signalling between damaged neurons and their contralateral homologues prevent the spread of peripheral nerve damage [79]. It has been recently reported that retinal laser burns to one eye abrogated ACAID bilaterally [80]. The authors postulate that substance P transmits early inflammatory signals from the lasered retina to the contralateral eye to induce changes to ocular immune privilege and has a central role in the bilateral loss of ACAID [81]. Whether some of the mentioned mechanisms are involved in the changes noted in the contralateral untreated eyes in our study deserves further investigation.

Our data suggest that 15 days after laser treatment, microglia activation in the retina is not related to laser injury but rather to IOP-derived effects. The presence of rod-like microglia was restricted to OHT. In contralateral eyes to OHT, despite the presence of signs of activation in microglia as well as macroglia (morphological changes and MHCII upregulation), neither rod-like microglia nor degenerated NF-200+RGCs were observed. Thus, it appears that the neurodegeneration associated to OHT induce the rod-like microglia phenotype.

The present study describes the differential behaviour of activated microglia that may accompany OHT-induced injury. The observations made support the role of the immune system in the pathogenesis of glaucomatous neurodegeneration. Whether or not the observations reported here could appear in other models of experimental OHT deserves further investigation.

Acknowledgements

The authors would like to thank Desirée Contreras, and Francisca Vargas for technical assistance, and David Nesbitt for correcting the English version of this work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RdH BR AIR BIG JJS FJV MA MPV MV AT JMR. Performed the experiments:

References

- Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE (1981) Optic nerve damage in human glaucoma. II. the site of injury and susceptibility to damage. *Arch Ophthalmol* 99: 635-649. doi:10.1001/archophth.1981.03930010635009. PubMed: 6164357.
- Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR (1988) Chronic human glaucoma causing selectively greater loss of large optic nerve fibers. *Ophthalmology* 95: 357-363. doi:10.1016/S0161-6420(88)33176-3. PubMed: 3174003.
- Quigley HA, Dunkelberger GR, Green WR (1989) Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107: 453-464. PubMed: 2712129.
- Kerrigan-Baumrind LA, Quigley HA, Pease ME, Kerrigan DF, Mitchell RS (2000) Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 741-748. PubMed: 10711689.
- Quigley HA, Broman AT (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90: 262-267. doi:10.1136/bjo.2005.081224. PubMed: 16488940.
- Sommer A (1989) Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107: 186-188. PubMed: 2913813.
- Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, Heuer DK, Higginbotham EJ et al. (2002) The ocular hypertension treatment study: Baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120: 20-20; discussion 10.1001/archophth.120.6.714. PubMed: 12049575.
- Crish SD, Calkins DJ (2011) Neurodegeneration in glaucoma: Progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience* 176: 1-11. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.036. PubMed: 21187126.
- Bosco A, Steele MR, Vetter ML (2011) Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol* 519: 599-620. doi:10.1002/cne.22516. PubMed: 21246546.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: A review. *Glia* 1: 301-307. doi:10.1002/glia.440010502. PubMed: 2976393.
- Zielasek J, Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv Neuroimmunol* 6: 191-222. doi:10.1016/0960-5428(96)00017-4. PubMed: 8876774.
- Graeber MB (2010) Changing face of microglia. *Science* 330: 783-788. doi:10.1126/science.1190929. PubMed: 21051630.
- Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 89-105. doi:10.1007/s00401-009-0622-0. PubMed: 20012873.
- Kreutzberg GW (1995) Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung* 45: 357-360. PubMed: 7763326.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318. doi:10.1016/0166-2236(96)10049-7. PubMed: 8843599.
- Ling EA, Ng YK, Wu CH, Kaur C (2001) Microglia: Its development and role as a neuropathology sensor. *Prog Brain Res* 132: 61-79. doi:10.1016/S0079-6123(01)32066-6. PubMed: 11545023.
- Hsu JC, Lee YS, Chang CN, Ling EA, Lan CT (2003) Sleep deprivation prior to transient global cerebral ischemia attenuates glial reaction in the rat hippocampal formation. *Brain Res* 984: 170-181. doi:10.1016/S0006-8993(03)03128-7. PubMed: 12932851.
- Luo XG, Ding JQ, Chen SD (2010) Microglia in the aging brain: Relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 5: 12. doi:10.1186/1750-1326-5-12. PubMed: 20334662.
- Suzumura A (2002) Microglia: Immunoregulatory cells in the central nervous system. *Nagoya J Med Sci* 65: 9-20. PubMed: 12083290.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ (2009) Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain* 132: 288-295. PubMed: 18567623.
- Perry VH, O'Connor V (2010) The role of microglia in synaptic stripping and synaptic degeneration: A revised perspective. *ASN. New_Eur*, 2: e00047. PubMed: 20967131.
- Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J (2012) Rod microglia: Elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation* 9: 247. doi:10.1186/1742-2094-9-247. PubMed: 23111107.
- Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J (2012) Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 225: 65-75. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.058. PubMed: 22960311.
- Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85: 145-157. PubMed: 5706753.
- Cho BP, Song DY, Sugama S, Shin DH, Shimizu Y et al. (2006) Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. *Glia* 53: 92-102. doi:10.1002/glia.20265. PubMed: 16206155.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS et al. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-1178. doi:10.1016/j.cell.2007.10.036. PubMed: 18083105.
- Fu QL, Li X, Shi J, Xu G, Wen W et al. (2009) Synaptic degeneration of retinal ganglion cells in a rat ocular hypertension glaucoma model. *Cell Mol Neurobiol* 29: 575-581. doi:10.1007/s10571-009-9349-7. PubMed: 19172389.
- Neufeld AH (1999) Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 117: 1050-1056. doi:10.1001/archophth.117.8.1050. PubMed: 10448748.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K et al. (2013) Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death. Drosophila Inf Service* 4: e525.
- Bodeutsch N, Siebert H, Derman C, Thanos S (1999) Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J Neurobiol* 38: 116-128. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199901)38:1. PubMed: 10027567.
- Joly S, Francke M, Ulbricht E, Beck S, Seeliger M et al. (2009) Cooperative phagocytes: Resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol* 174: 2310-2323. doi:10.2353/ajpath.2009.090023. PubMed: 19435787.
- Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI et al. (2012) IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J Neuroinflammation* 9: 92. doi:10.1186/1742-2094-9-92. PubMed: 22583833.
- Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Jiménez-López M et al. (2009) Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino swiss mice. *Mol Vis* 15: 2578-2598. PubMed: 20011633.
- Cuenca N, Pinilla I, Fernández-Sánchez L, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L et al. (2010) Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino swiss mice. *Exp Eye Res* 91: 273-285. doi:10.1016/j.exer.2010.05.020. PubMed: 20650699.
- Wang X, Ng YK, Tay SS (2005) Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats. *J Neurosci Res* 82: 674-689. doi:10.1002/jnr.20679. PubMed: 16273539.

36. Danias J, Kontiola AI, Filippopoulos T, Mittag T (2003) Method for the noninvasive measurement of intraocular pressure in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 1138–1141. doi:10.1167/iovs.02-0553. PubMed: 12601041.
37. Aihara M, Lindsey JD, Weinreb RN (2003) Twenty-four-hour pattern of mouse intraocular pressure. *Exp Eye Res* 77: 681–686. doi:10.1016/j.exer.2003.08.011. PubMed: 14609556.
38. Drouyer E, Dkhihi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G et al. (2008) Glaucoma alters the circadian timing system. *PLOS ONE* 3: e3931. doi:10.1371/journal.pone.0003931. PubMed: 19079596.
39. Ramirez JM, Triviño A, Ramirez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J (1994) Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res* 34: 1935–1946. doi:10.1016/0042-6989(94)90024-8. PubMed: 7941395.
40. Triviño A, De Hoz R, Salazar JJ, Ramírez AI, Rojas B et al. (2002) Distribution and organization of the nerve fiber and ganglion cells of the human choroid. *Anat Embryol (Berl)* 205: 417–430. doi:10.1007/s00429-002-0257-6. PubMed: 12382145.
41. Kezic JM, Chrysostomou V, Trousce IA, McMenamin PG, Crowston JG (2013) Effect of anterior chamber cannulation and acute IOP elevation on retinal macrophages in the adult mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 3028–3036. doi:10.1167/iovs.13-11865. PubMed: 23572110.
42. Thanos S (1991) Specific transcellular carbocyanine-labelling of rat retinal microglia during injury-induced neuronal degeneration. *Neurosci Lett* 127: 108–112. doi:10.1016/0304-3940(91)90906-A. PubMed: 1881605.
43. Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2000) Microglial cells in the retina of *carassius auratus*: Effects of optic nerve crush. *J Comp Neurol* 417: 431–447. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000221)417:4. PubMed: 10701865.
44. Wang X, Sam-Wah Tay S, Ng YK (2000) Nitric oxide, microglial activities and neuronal cell death in the lateral geniculate nucleus of glaucomatous rats. *Brain Res* 878: 136–147. doi:10.1016/S0006-8993(00)02727-X. PubMed: 10996144.
45. Wang X, Tay SS, Ng YK (2000) An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res* 132: 476–484. doi:10.1007/s002210000360. PubMed: 10912828.
46. Chauhan BC, Pan J, Archibald ML, LeVatte TL, Kelly MEM et al. (2002) Effect of intraocular pressure on optic disc topography, electroretinography, and axonal loss in a chronic pressure-induced rat model of optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2969–2976. PubMed: 12202517.
47. Naskar R, Wissing M, Thanos S (2002) Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial in the retina of a rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2962–2968. PubMed: 12202516.
48. Lam TT, Kwong JMK, Tso MOM (2003) Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 638–645. doi:10.1167/iovs.02-0255. PubMed: 12556393.
49. Sobrado-Calvo P, Vidal-Sanz M, Villegas-Pérez MP (2007) Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor. *J Comp Neurol* 501: 866–878. doi:10.1002/cne.21279. PubMed: 17311318.
50. Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC (2007) Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3161–3177. doi:10.1167/iovs.06-1282. PubMed: 17591886.
51. Galindo-Romero C, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, García-Ayuso D, Villegas-Pérez MP et al. (2013) Effect of brain-derived neurotrophic factor on mouse axotomized retinal ganglion cells and phagocytic microglia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 974–985. doi:10.1167/iovs.12-11207. PubMed: 23307961.
52. Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S (2006) Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3595–3602. doi:10.1167/iovs.05-1522. PubMed: 16877434.
53. Dorrell MI, Aguilar E, Jacobson R, Trauger SA, Friedlander J et al. (2010) Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy. *Glia* 58: 43–54. doi:10.1002/glia.20900. PubMed: 19544395.
54. Vessey KA, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL (2011) Characterization of retinal function and glial cell response in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Comp Neurol* 519: 506–527. doi:10.1002/cne.22530. PubMed: 21192081.
55. del Río-Hortega P (1920) Estudios sobre la neuroglía.- la microglía y su transformación en células en bastoncillo y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* 9: 1–46.
56. del Río Hortega P (1932) Microglia. In: W Penfield. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol. 2, pp. 481–534, New York: PB Hoeber
57. Masuda T, Croom D, Hida H, Kirov SA (2011) Capillary blood flow around microglial somata determines dynamics of microglial processes in ischemic conditions. *Glia* 59: 1744–1753. doi:10.1002/glia.21220. PubMed: 21800362.
58. Svensson M, Aldskogius H (1993) Synaptic density of axotomized hypoglossal motoneurons following pharmacological blockade of the microglial cell proliferation. *Exp Neurol* 120: 123–131. doi:10.1006/exnr.1993.1046. PubMed: 8477825.
59. Trapp BD, Wujek JR, Criste GA, Jalabi W, Yin X et al. (2007) Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia* 55: 360–368. doi:10.1002/glia.20462. PubMed: 17136771.
60. Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG (2011) Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflamm* 8: 174. doi:10.1186/1742-2094-8-174. PubMed: 22152337.
61. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29: 3974–3980. doi:10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009. PubMed: 19339593.
62. del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X et al. (2007) Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke* 38: 646–651. doi:10.1161/01.STR.0000254477.34231.cb. PubMed: 17261708.
63. Medema JP, Borst J (1999) T cell signaling: A decision of life and death. *Hum Immunol* 60: 403–411. doi:10.1016/S0198-8859(99)00008-7. PubMed: 10447398.
64. Broderick C, Duncan L, Taylor N, Dick AD (2000) IFN- γ and LPS-mediated IL-10-Dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2613–2622. PubMed: 10937574.
65. Raes G, Noël W, Beschin A, Brys L, de Baetselier P et al. (2002) FIZZ1 and ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Dev Immunol* 9: 151–159. doi:10.1080/1044667031000137629. PubMed: 12892049.
66. Bhatia S, Fei M, Yarlagadda M, Qi Z, Akira S et al. (2011) Rapid host defense against *aspergillus fumigatus* involves alveolar macrophages with a predominance of alternatively activated phenotype. *PLOS ONE* 6: e15943. doi:10.1371/journal.pone.0015943. PubMed: 21246055.
67. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37–40. doi:10.1038/35065000. PubMed: 11242034.
68. Graeber MB, Mehraein P (1994) Microglial rod cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 178–180. PubMed: 8072649.
69. Jonas RA, Yuan TF, Liang YX, Jonas JB, Tay DKC et al. (2012) The spider effect: Morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLOS ONE* 7: e30763. doi:10.1371/journal.pone.0030763. PubMed: 22363486.
70. Suzumura A, Sawada M, Yamamoto H, Marunouchi T (1990) Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro. *J Neuroimmunol* 30: 111–120. doi:10.1016/0165-5728(90)90094-4. PubMed: 2229405.
71. Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH, Toft-Hansen H, Dalmau I et al. (2007) Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience* 149: 112–122. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.06.037. PubMed: 17870248.
72. Suzumura A, Tamaru T, Yoshikawa M, Takayanagi T (1999) Multinucleated giant cell formation by microglia: Induction by interleukin (IL)-4 and IL-13. *Brain Res* 849: 239–243. doi:10.1016/S0006-8993(99)02164-2. PubMed: 10592309.
73. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A (2005) Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 81: 48–56. doi:10.1016/j.exer.2005.01.012. PubMed: 15978254.
74. Panagis L, Thanos S, Fischer D, Derman CR (2005) Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *Eur J Neurosci* 21: 2305–2309. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04046.x. PubMed: 15869529.
75. Becher B, Prat A, Antel JP (2000) Brain-immune connection: Immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 29: 293–304. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(20000215)29:4. PubMed: 10652440.
76. Tezel G, Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group. (2009) The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50: 1001–12

77. Donaldson LF, McQueen DS, Seckl JR (1995) Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: Maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. *J Physiol* 486 (2): 473-482. PubMed: 7473211.
78. Kelly S, Dunham JP, Donaldson LF (2007) Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *Eur J Neurosci* 26: 935-942. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05737.x. PubMed: 17714187.
79. Kolston J, Lisney SJ, Mulholland MN, Passant CD (1991) Transneuronal effects triggered by saphenous nerve injury on one side of a rat are restricted to neurones of the contralateral, homologous nerve. *Neurosci Lett* 130: 187-189. doi:10.1016/0304-3940(91)90393-8. PubMed: 1795879.
80. Qiao H, Lucas K, Stein-Streilein J (2009) Retinal laser burn disrupts immune privilege in the eye. *Am J Pathol* 174: 414-422. doi:10.2353/ajpath.2009.080766. PubMed: 19147817.
81. Lucas K, Karamichos D, Mathew R, Zieske JD, Stein-Streilein J (2012) Retinal laser burn-induced neuropathy leads to substance P-dependent loss of ocular immune privilege. *J Immunol* 189: 1237-1242. doi: 10.4049/jimmunol.1103264. PubMed: 22745377.

Apéndice c

Quantification of the Effect of Different Levels of IOP in the Astroglia of the Rat Retina Ipsilateral and Contralateral to Experimental Glaucoma

Ana I. Ramírez,¹ Juan J. Salazar,¹ Rosa de Hoz,¹ Blanca Rojas,¹ Beatriz I. Gallego,¹ Manuel Salinas-Navarro,² Luis Alarcón-Martínez,² Arturo Ortín-Martínez,² Marcelino Avilés-Trigueros,² Manuel Vidal-Sanz,² Alberto Triviño,¹ and Jose M. Ramírez¹

PURPOSE. To analyze the effects of different levels of intraocular pressure (IOP) in the macroglia in ocular hypertension (OHT) and contralateral eyes at 3 weeks after laser photocoagulation and compare these with effects in age-matched control rats.

METHODS. Adult Sprague-Dawley rats were divided into an age-matched control (naïve) group and an OHT group. Retinas were processed as whole mounts and immunostained with GFAP for analysis of the retinal macroglia.

RESULTS. The area of the retina occupied by astrocytes (AROA) was quantified. GFAP immunostaining showed common features in ipsilateral and contralateral eyes. First, although the astrocyte network maintained a star-shaped morphology, these cells had fewer secondary processes and thinner cell bodies and primary processes than did naïve cells. Second, Müller cells appeared as punctate GFAP+ structures among astrocytes. Third, there was a significant reduction of the AROA in ipsilateral and contralateral eyes compared with naïve eyes. Ipsilateral eyes had significantly less AROA than did contralateral eyes. The decrease was greater for OHT eyes with higher IOP levels.

CONCLUSIONS. OHT induces changes in the macroglia of contralateral eyes; thus, these fellow eyes should not be used as control. In eyes with OHT, there is a close relationship between IOP values and decreased AROA. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:5690–5696) DOI:10.1167/iovs.10-5248

It is known that several mechanisms participate in the death of retinal ganglion cells (RGCs) in glaucoma^{1–8}; however, the physiopathological mechanisms involved in RGC death

remain poorly understood.^{9,10} During recent years, several reports on glial behavior in ocular hypertension (OHT) and ischemia have suggested that in some diseases, such as primary open-angle glaucoma, glial cells may be involved in RGC dysfunction.¹¹

Under normal conditions, Müller cells appear to participate in the maintenance of RGC survival by mechanisms only partially known.^{12,13} Astrocytes are an abundant cell type in the optic nerve and the retina that are intercommunicated with the neurons and the surrounding connective tissue through their microenvironment, and together these components function as a unit.¹⁴ Astrocytes participate in the detoxification and in the structural and metabolic support¹⁵ of the nervous system and neuronal protectors during the aging process.¹⁶

Under pathologic conditions, such as glaucoma, there is a reduction of the RGCs and their axons in addition to a decrease in neural cells in the lateral geniculate nucleus and the visual cortex.¹⁷ Such a scenario, which is associated with a glial response that varies depending on whether the cell is astroglia or Müller glia, can be reproduced in experimental glaucoma.

Astrocytes are known to have the capacity to regulate the immune response in the central nervous system,^{18,19} the retina, and the optic nerve. In the eye, Müller cells also participate in the immune response.²⁰ In glaucoma, glial reactivity is associated with an upregulation of class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC).²¹ The immune response could be protective or destructive, depending on whether there is efficient control of the intrinsic immunoregulatory mechanism,²² and could explain the glial reactivity observed in the contralateral eyes of animals with unilaterally induced experimental glaucoma.²³

As discussed, glaucomatous eyes lose RGCs and have a glial response that is also apparent in the contralateral retina. However, it is not well established whether there is any relationship between different levels of OHT and the magnitude of the OHT-induced changes in the population of retinal astrocytes.

The aim of the present work, using a rat model of laser-induced OHT, was to analyze the effects of OHT on retinal astrocytes and Müller cell populations in the treated eye, the changes in retinal macroglia in the contralateral-fellow untreated eyes, and any relationship between different levels of OHT and the magnitude of the OHT-induced changes in the population of astrocytes in both lasered and contralateral untreated eyes.

From the ¹Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, Universidad Complutense, Madrid, Spain; and the ²Departamento de Oftalmología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Murcia, Spain.

Supported by RETICs Patología Ocular del Envejecimiento, Calidad Visual y Calidad de Vida (Grants ISCIII RD07/0062/0000 and RD07/0062/0001, Spanish Ministry of Science and Innovation); Fundación Mutua Madrileña (Grant 4131173); and research grants from the Regional Government of Murcia Fundación Séneca 04446/GERM/07.

Submitted for publication January 21, 2010; revised April 12 and May 21, 2010; accepted May 21, 2010.

Disclosure: A.I. Ramírez, None; J.J. Salazar, None; R. de Hoz, None; B. Rojas, None; B.I. Gallego, None; M. Salinas-Navarro, None; L. Alarcón-Martínez, None; A. Ortín-Martínez, None; M. Avilés-Trigueros, None; M. Vidal-Sanz, None; A. Triviño, None; J.M. Ramírez, None

Corresponding author: José M. Ramírez, Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo, School of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; ramirezj@med.ucm.es.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Anesthetics

Female albino Sprague-Dawley (SD) adult (weight range, 180–200 g) rats obtained from the breeding colony of the University of Murcia (Murcia, Spain) were housed in temperature- and light-controlled rooms with a 12-hour light/12-hour dark cycle and had ad libitum access to food and water. Light intensity within the cages ranged from 9 to 24 lux. Animal manipulations followed institutional guidelines, European Union regulations for the use of animals in research, and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. All surgical manipulations were carried out under general anesthesia induced with intraperitoneal (IP) injection of a mixture of ketamine (70 mg/kg, Ketalar; Parke-Davies, S.L., Barcelona, Spain) and xylazine (10 mg/kg, Rompun; Bayer, S.A., Barcelona, Spain). Animals were killed by IP injection of an overdose of pentobarbital (Dolethal; Vétoquinol, Especialidades Veterinarias, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain).⁹

Induction of Ocular Hypertension and IOP Measurements

The left eyes were treated in a single session with diode laser burns (Viridis Ophthalmic Photocoagulator 532-nm laser; Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France), as recently described in detail.⁹ In brief, the laser beam was directly delivered on anesthetized rats without any lenses and was aimed at the trabecular meshwork and the perilimbal and episcleral veins. The spot size, duration, and power used were 50 to 100 μm , 0.5 seconds, and 0.4 W, respectively. Each rat received between 65 and 90 burns.

IOP was measured in both eyes with a tonometer (Tono-Pen XL; Reichert Ophthalmic Instruments Depew, NY)^{24,25} while rats were under anesthesia (Colircusí anestésico doble; Alcón Cusí, S.A., Barcelona, Spain) before and 1 and 2 weeks after laser photocoagulation (LP) in those with OHT and before kill in age-matched controls.

At each time point, 8 to 12 consecutive readings were carried out for each eye and were averaged. To avoid fluctuations of the IOP because of the circadian rhythm^{25–27} or because of elevation of the IOP itself,²⁸ we tested IOP consistently around the same time, preferentially in the morning and directly after deep anesthesia in all rats (with OHT and age-matched control). Moreover, because general anesthesia lowers IOP in the rat, we measured the IOP of the treated eye as well as the contralateral intact fellow eye in all the experiments.

Experimental Groups

Two groups of animals were considered for the study: an age-matched control group (naive, $n = 10$) and a group designed to determine the effects of OHT on retinal macroglia (OHT, $n = 14$). The OHT group was processed 3 weeks after LP.

Immunohistochemistry

The rats were deeply anesthetized and perfused transcardially through the ascending aorta first with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4).

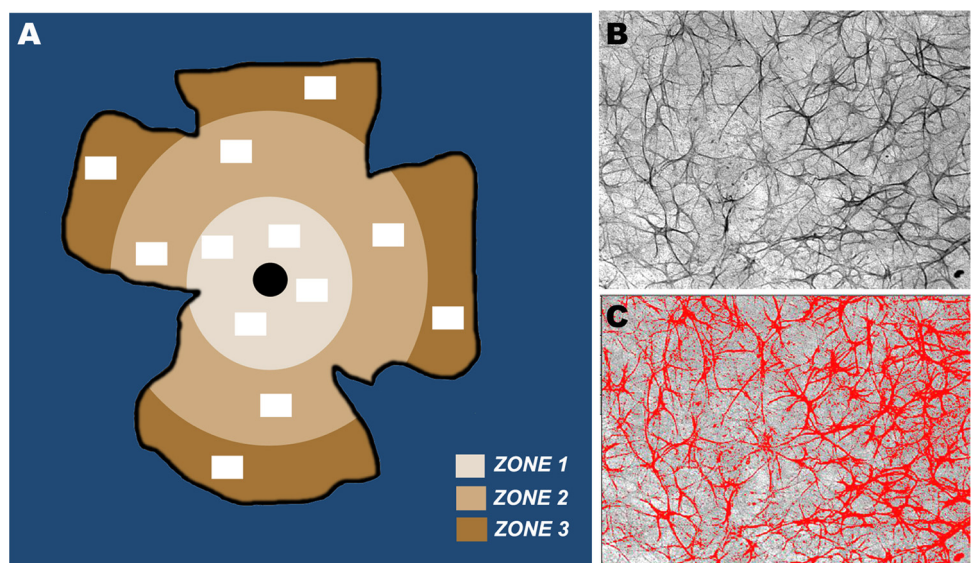
The retinas from both eyes were dissected and processed as whole mounts after the immunohistochemical protocol described elsewhere.²⁹ A monoclonal antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP clone GA-5; Sigma, St. Louis, MO) was used in a 1:250 dilution.

Retinal Analysis: Area of the Retina Occupied by Astrocytes

Retinal astrocytes are interconnected, forming a network (Ramírez JM, et al. *IOVS* 2005;46:ARVO E-Abstract 1318).²⁹ This situation hampers the differentiation of individual cells for cell counting, leading us to consider the area of the retina occupied by astrocytes (AROA) to be a suitable zone to quantify rat retinal astroglia.

To quantify the AROA, we used a computer-assisted morphometric analysis system (Metamorph Imaging System, version 5; Universal Imaging Corp., Downingtown, PA) in association with an imaging microscope (Axioplan 2; Zeiss, Göttingen, Germany). For the study, each retinal whole mount was divided into three zones that extended concentrically from the optic nerve to the periphery as follows: central (zone 1), intermediate (zone 2), and peripheral (zone 3). Photomicrographs of four areas from each zone (12 areas per retina) were taken at random. The only selection criteria were good tissue quality, good staining, and clear visualization of astrocytes (Figs. 1A, 1B). Photomicrographs were taken at 20 \times , covering an area of 0.18890 mm² (Figs. 1B, 1C). Resultant images were processed with the Threshold Tool of the computer-assisted morphometric analysis system (Metamorph Imaging System, version 5; Universal Imaging Corp.). Areas of the image that were marked with red threshold overlay (as a visual indicator of the threshold areas, in this study GFAP+ astrocytes; Fig. 1C) were included in the measurement and processing (Ramírez JM, et al. *IOVS* 2005;46:ARVO E-Abstract 1318). Individual images were taken with a digital high-resolution camera (CoolSNAP; Photometrics, Tucson, AZ) and were further processed when required (Photoshop CS3 Extended 10.0; Adobe Systems, Inc., San Jose, CA).

FIGURE 1. Rat retinal whole mount. (A) Division of the retina in concentric zones for study and areas of retina selected at random from each zone. (B) Photomicrograph of one of the selected areas of the retina. (C) Same area shown in (B) processed with the threshold tool in an imaging system. Red: marked retinal astrocytes that were included in the measurements and processing.



Statistical Analysis

IOP data and AROA among the ipsilateral eyes, the contralateral eyes, and age-matched normal retinas were compared using nonparametric ANOVA with Bonferroni test. A *t*-test was used to compare the IOP between the age-matched control and the contralateral eyes and to compare the AROA, depending on the IOP level. Data are shown as mean ± SD. Differences were considered significant when *P* < 0.05. Pearson correlation was used to analyze the relation between the mean AROA and the mean IOP of each eye.

RESULTS

Age-Matched Control (Naive)

In naive rats, Müller glial cells were undetected for GFAP staining (Figs. 2A–C). GFAP immunoreactivity (GFAP-IR) was localized in stellate astrocytes spaced in a regular fashion in the ganglion cell layer as viewed from the surface (Figs. 2A–C, 3A).

Laser-Induced Ocular Hypertension

Photocoagulation of the trabecular meshwork and the perilimbal and episcleral veins resulted in a sustained increase in IOP.

There was some variability among the maximum IOP values registered from the lasered eyes within the animals, but overall the results were consistent. IOP values of ipsilateral eyes (21.05 ± 1.73) significantly differed from those of naive (16.90 ± 0.68 ; *P* < 0.001) and contralateral untreated (16.70 ± 0.76 ; *P* < 0.001) eyes. No significant differences were found between contralateral and naive.

Effects of OHT in the Retinal Macroglia of the Lasered Eyes

The Müller cells of ipsilateral eyes exhibited GFAP-IR (Figs. 2K, 2M–O, 3D), which appeared as punctate structures between the astrocytes and their radiating processes. This immunostaining varied, depending on IOP values ranging from moderate to intense. In some retinal areas of eyes with higher IOP, Müller cells formed GFAP+ glial scars that precluded astrocyte visualization (Fig. 3F).

No differences in the intensity of astrocyte GFAP-IR of eyes with OHT (Figs. 2J, 2K, 2N) and the contralateral eyes (Figs. 2D, 2E, 2G) were detected in comparison with naive (Fig. 2B) eyes. Overall, astrocytes of the ipsilateral eyes maintained the star-shaped morphology and location similar to those of the

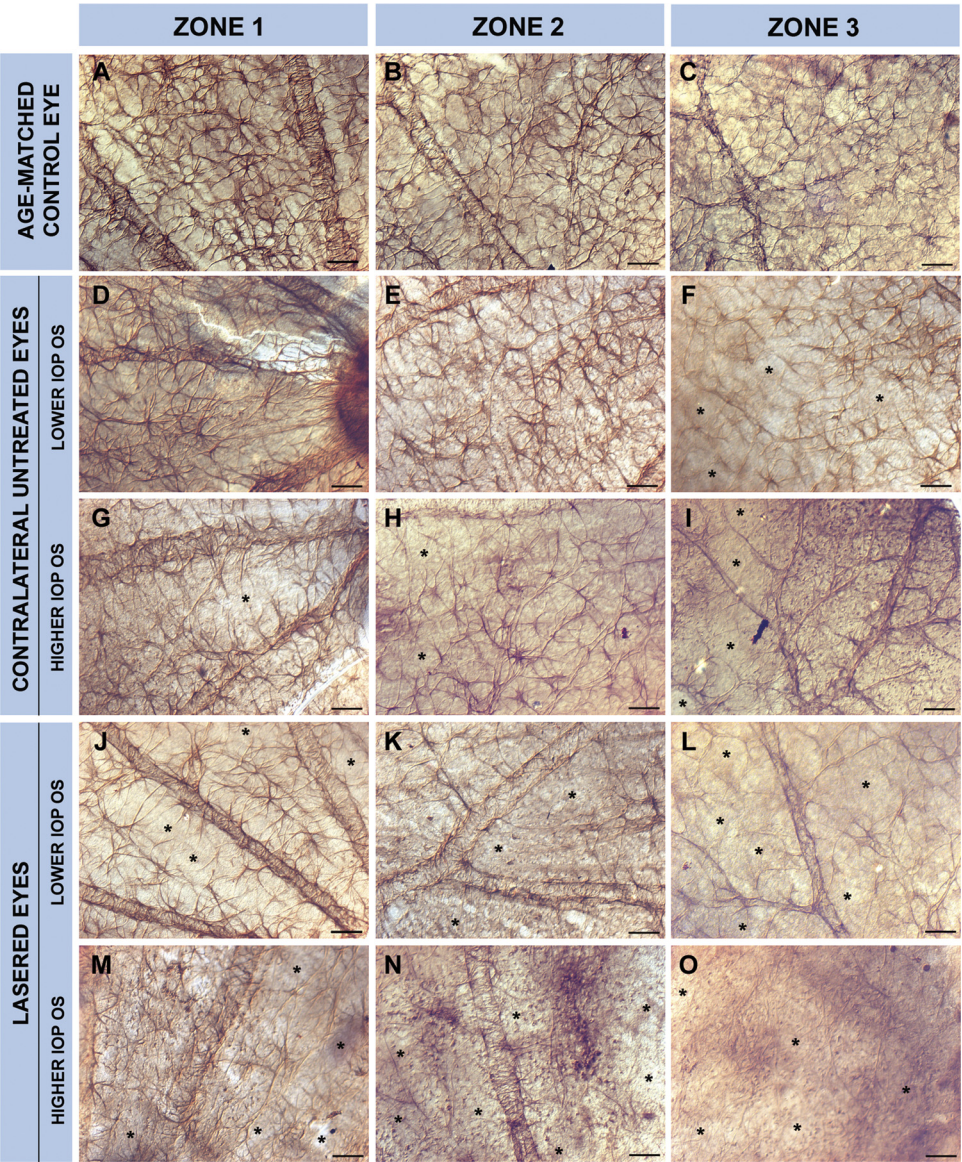


FIGURE 2. Comparison by concentric zones chosen for study of the retinal area occupied by astrocytes. Anti-GFAP immunostaining. The intensity of the immunostaining did not differ between the study groups, as observed in the astrocytes located on the vessel wall (A, B, D, E, G, J, K, N). The network of astrocytes was less dense than naive in the three zones analyzed in both ipsilateral and contralateral untreated eyes. In both instances, areas of retina devoid of astrocytes were detected (*asterisks*). The reduction of the area of the retina occupied by astrocytes was greater in lasered eyes (J–O) than in the fellow untreated eyes (D–I). The decrease was more intense for those eyes with higher IOP levels (M–O). Müller cells appeared as GFAP+ punctate structures in both contralateral untreated (E, G, I) and ipsilateral (K, M, N, O) eyes. Contralateral retinas of treated eyes with lower IOP levels (D–F). Contralateral retinas of treated eyes with higher IOP levels (G–H). Zone 1, central; zone 2, intermediate; zone 3, periphery. Scale bars, 50 μ m. Nomarski optic.

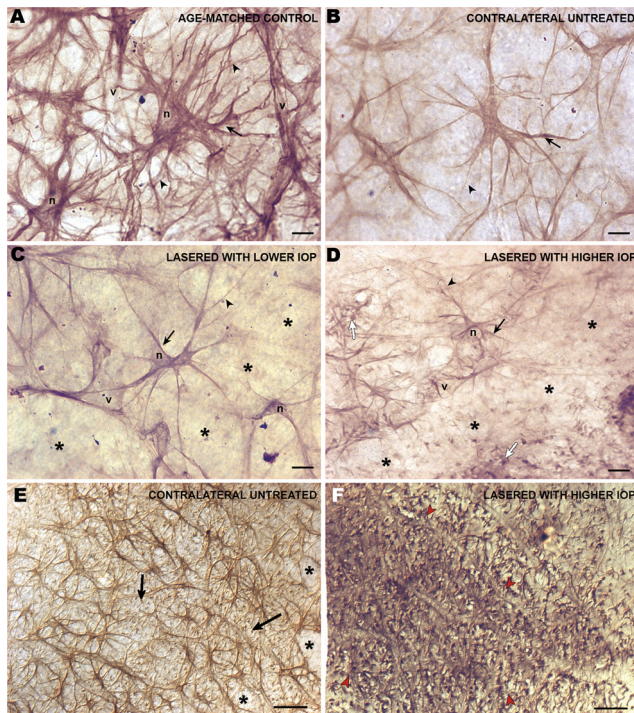


FIGURE 3. Morphology of the retinal glia in the different study groups. (A) Astrocytes of age-matched control have a stellate morphology and an oval cell body from which six to eight primary processes (arrow) extended outward and divided into finer secondary ones (arrowhead). (B–D) Astrocytes of ipsilateral and contralateral eyes had fewer secondary processes (arrowhead), and most cell bodies and primary processes (arrow) were thinner than in age-matched control. Müller cells appeared as GFAP+ punctate structures (white arrow). (E, F) GFAP-immunoreaction of Müller cells in a rat with a higher IOP level. (E) GFAP-IR of Müller cells (black arrow) in the contralateral untreated eye. (F) In some retinal areas of the eyes with OHT, Müller cells formed GFAP+ glial scars (red arrowhead) that precluded astrocyte visualization. Such scars were observed neither in naive nor contralateral untreated eyes. n, nucleus; v, blood vessels. Scale bars: (A–D) 10 μ m; (E, F) 50 μ m; Nomarski optic.

naive group. However, the astrocytes of ipsilateral eyes had fewer secondary processes, and most cell bodies and primary processes were thinner than in the naive group (Figs. 3C, 3D). Additionally, the astroglial network was less dense and exhibited areas devoid of astrocytes (Figs. 2J–O) compared with the naive group (Figs. 2A–C). Astrocytes in the ipsilateral eyes with lower IOP levels formed a plexus of star-shaped cells in the three zones analyzed (Figs. 2J–L). However, in most samples of ipsilateral eyes with higher IOP levels, the stellate astroglial network could not be recognized in zone 2 (intermediate; Fig. 2N) or zone 3 (periphery; Fig. 2O) primarily because of astrocyte loss.

Effects of OHT in the Retinal Macroglia of the Contralateral Untreated Eyes

Three weeks after LP, contralateral eyes had macroglial alterations regardless of the IOP value of the ipsilateral eye (Figs. 2D–I). As in eyes with OHT, Müller cells of contralateral eyes differed from naive eyes in exhibiting GFAP-IR (Figs. 2E, 2G, 2I, 3E); however, the glial scars observed in ipsilateral eyes (Figs. 2N, 2O, 3F) were not found in the contralateral untreated eyes (Figs. 2G–I, 3E). Astrocytes of the contralateral eyes formed a plexus of star-shaped cells distributed throughout the retina (Figs. 2D–I), as in naive eyes (Figs. 2A–C). Retinal areas devoid of astrocytes were also detected in the contralateral eyes (Figs.

2F–I), though to a lesser extent than in ipsilateral eyes. As in ipsilateral eyes, astrocytes of contralateral eyes had fewer secondary processes, and most of the cell bodies and primary processes were thinner (Fig. 3B) than in naive eyes (Fig. 3A).

Area of the Retina Occupied by Astrocytes

In 2 of 14 contralateral retinas, the quality of the immunostaining was inappropriate for AROA quantification.

The AROA of treated eyes showed statistically significant reductions compared with naive ($P < 0.001$) and contralateral untreated ($P < 0.001$) eyes. This feature was observed when the analysis was made both by retinal areas (12 target areas per retina) and by concentric zones of the retina ($P < 0.001$ for all comparisons) (ANOVA with Bonferroni test). Notably, the AROA in contralateral eyes was statistically significantly reduced compared with naive retinas ($P < 0.001$) (Fig. 4).

Analysis of the AROA in the three groups of eyes studied (naive, ipsilateral, and contralateral) revealed that the AROA in the periphery was significantly reduced compared with the central ($P < 0.001$) and intermediate ($P < 0.001$) zones (ANOVA with Bonferroni test) (Figs. 2, 4).

In OHT, there was a strong correlation ($r = -0.808$; $P < 0.001$) between the mean AROA ($n = 26$) and the mean values of IOP ($n = 26$) of each eye. In contralateral eyes, there was a weak correlation ($r = 0.296$; $P < 0.351$) between mean AROA ($n = 12$) and the mean values of the IOP of the treated eyes ($n = 12$) (Fig. 5).

DISCUSSION

Three weeks after LP, treated eyes experienced significant elevations in IOP compared with contralateral and naive eyes. In parallel studies using a similar methodology, the IOP reportedly increased between 34% and 125% over baseline within the first 72 hours after laser treatment and peaked at 12 hours. At 1 and 2 weeks, the IOP was approximately 35% and 39% over baseline. By 3 weeks the IOP started to decline, acquiring close to normal levels at 12 weeks.⁹

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a very sensitive marker of glial activation in response to several types of neural insults. The difficulties in distinguishing astrocytes from Müller cells by GFAP immunostaining when using cross-sections are attributed to the fact that astrocytes within the nerve fiber layer express GFAP immunostaining, and Müller cells gain GFAP-IR under a variety of pathologic conditions.²³ The use of flat-mounted preparations of the retina facilitates the differentiation of astrocytes from Müller glial cell end-feet, which otherwise are not readily distinguishable in a sectional profile.³⁰ In addition, chronically elevated IOP led to the overall increase in the GFAP content of the rat retina, as detected by one-dimensional electrophoresis and immunoblotting despite the reduced GFAP-IR in astrocytes.²³ This fact further underscores the usefulness of retinal flat mounts in evaluating astrocyte reactivity.

Some studies have reported that the aging process increases GFAP-IR in the human brain,^{31,32} an observation that has also been reported in the astrocytes of the human retina.¹⁴ Aging does not affect glial activity in the rat optic nerve head until 20 months of age.³³ Thus, in the present study, we used rats at approximately 6 months of age because, at this age, they do not exhibit glial changes compared with retinas of younger animals.

Previous studies using thin sections reported that GFAP-IR and content were increased in human and animal retinas with elevated IOP.^{33–36} GFAP-IR of the Müller glia has been reported as early as at the third day after glaucoma induction and persisted for 6 months.²³ In the present study, the intensity

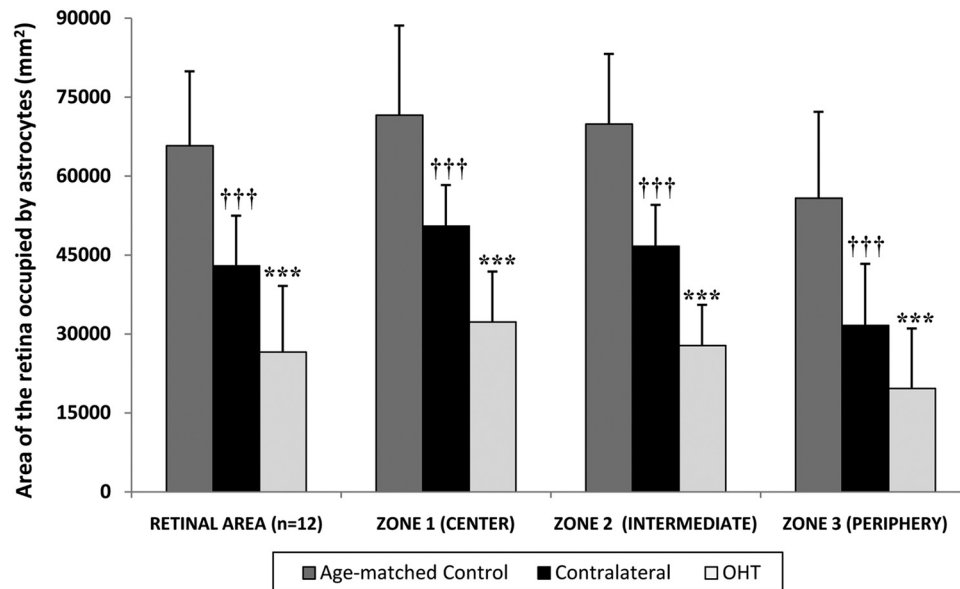


FIGURE 4. AROA. Comparison among concentric zones and areas of the retina analyzed in the three study groups. The AROA of treated eyes underwent a statistically significant reduction in comparison with naive ($P < 0.001$) and contralateral untreated ($P < 0.001$) eyes. This feature was observed when the analysis was made both by retinal areas (12 target areas per retina) and by concentric zones of the retina ($P < 0.001$ for all comparisons). Notably, the AROA in the contralateral untreated eyes showed a statistically significant reduction in comparison with age-matched normal retinas ($P < 0.001$). In the three study groups the peripheral zone had statistically significant less AROA than did the central ($P < 0.001$) and intermediate ($P < 0.001$) zones. Each bar represents the mean \pm SD of AROA; ANOVA with Bonferroni test. Statistically significant reduction (***) compared with age-matched control and contralateral untreated retinas. Statistically significant reduction (†††) compared with age-matched control retinas.

of the GFAP-IR of Müller cells was greater in ipsilateral eyes with higher levels of IOP to such an extent that in some areas, glial scars precluded the visualization of astrocytes. The formation of glial scars in response to OHT has previously been reported.^{37,38}

It has been suggested that the postinjury responses of RGCs may elicit a number of glial reactions that have not been completely understood. Retinal astrocytes are able to develop early cellular hypertrophy (because of the upregulation of GFAP+ intermediate filaments, among others) in response to OHT, which increases with time and high IOP.³⁹ These features have also been found in the astrocytes of the optic nerve.^{7,40,41} On the other hand, it has been reported that the GFAP-IR of retinal astrocytes in rats with OHT induced by episcleral vein cauterization is dramatically reduced after 3 days of increased IOP.²³

Astrocytes of lasered eyes had thinner cell bodies, fewer secondary processes, and thinner primary processes than those of naive eyes rather than a cellular hypertrophy in response to OHT. Another finding that deserves consideration was that the level of IOP influenced these morphologic changes as well as the amount of AROA lost in such a way that the group with higher levels of IOP had the greater changes. Both facts might explain why, in these retinas, it was difficult to recognize the astroglial network in zones 2 (intermediate) and 3 (periphery).

The retinas of the contralateral untreated eyes had qualitative changes in macroglia similar to those in ipsilateral eyes and significantly fewer astrocytes than in naive eyes. Given that there were no significant differences in IOP values between contralateral and naive eyes, the changes observed in the contralateral retinas could have been driven by the effects of OHT in treated eyes. Kanamori et al.²³ described a gradual change in the GFAP-IR of the Müller cells in the contralateral retina from day 3 after episcleral vein cauterization. Moderate GFAP-IR of the Müller cells has also been reported in the

contralateral eye after optic nerve crush.⁴² It has been postulated that bilateral glial proliferation might represent a common acute response to degeneration events both in injured and in contralateral retinas.⁴³ The glial reactivity observed in the contralateral eye could be related to the potential of the glial cells to initiate, regulate, and sustain an immune response.⁴⁴ Similarly, astrocytes of the optic nerve are thought to be capable of mediating immunoreactions, because of their expression of the MHC class II molecule HLA-DR, which is activated in glaucomatous human retina and optic nerve head.^{21,45,46} Glial MHC molecules are also upregulated in experimental animal models of glaucoma. It has been postulated that a stimulated T-cell response may be correlated with neuronal damage (Tezel G, et al. *IOVS* 2008;49:ARVO E-Abstract 3699).^{22,47} T-cell-derived proinflammatory mediators could act directly on neuronal cells or indirectly by activating local glial cells and attracting and stimulating blood-borne macrophages.⁴⁷ It has also been suggested that multiple cell responses in the contralateral eye could be due to the crossing fibers at the optic chiasma or some retinorecinal fibers present in rodents.⁴² There are other instances of contralateral effects after unilateral tissue damage. It is now well accepted that neurogenic mechanisms contribute to the symmetrical spread of inflammation in rheumatoid arthritis^{48,49} and that transneuronal signaling between damaged neurons and their contralateral homologues prevent the spread of peripheral nerve damage.⁵⁰ Whether these neurogenic mechanisms are involved in the changes observed in the contralateral untreated eyes in our study deserves further investigation.

We found a strong decreasing linear relationship between IOP and AROA in OHT ($r = -0.808$; $P < 0.001$). Similarly, in primary open-angle glaucoma, the increase in IOP resulted in a progressive loss of RGC axons. In the present experiments, we did not estimate RGC survival, but in a recent parallel study using a comparable methodology to induce OHT, RGC loss was

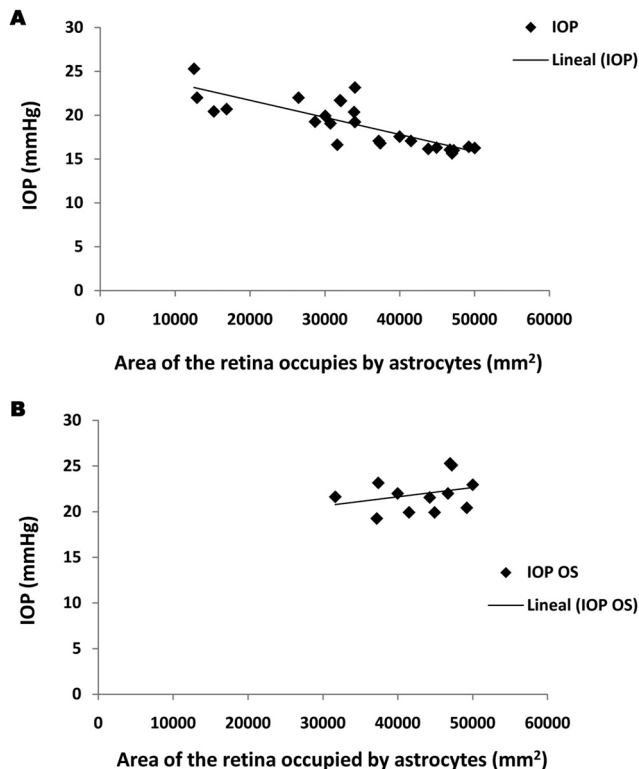


FIGURE 5. IOP versus area of the retina occupied by astrocytes. (A) In OHT, there was a strong linear relationship between the mean AROA and the mean values of IOP of each eye. (B) In contralateral eyes, there was weak linear relationship between mean AROA and the mean values of the IOP of the treated eyes.

documented using a retrograde tracer applied to both superior colliculi 1 week before animal processing.⁹ It is possible that RGC death results from a decrease in glial support, as might be deduced by the activation of the Müller glia and by the reduction of the AROA observed in the present study. Reactive glial cells can exacerbate neuronal damage and may be one of the etiologies of glaucoma through the release of cytokines, reactive oxygen species, and functional disorders of the glutamate uptake in Müller cells.^{51,52} On the other hand, we know that astrocytes support damaged neural tissues through the release of neurotrophic factors, antioxidants, and degradation of extracellular deposits.⁵³ A minimal amount of retina occupied by astrocytes may be necessary to protect RGCs from death; that is, RGC death would begin when astrocytes of the retina diminish beyond a specific level.

Another factor contributing to the impairment of the glial support could be the reduction of astrocyte secondary processes observed in this study. In the human retina, astroglial processes join together by means of desmosomes^{15,54} and gap junctions¹⁵ to form a mesh that reinforces the capillary network and supports the neurons in the glial network. These kinds of junctions between processes have also been reported in rats⁵⁵ and in other animal species.^{56,57} It is known that astrocytes play a decisive role in the metabolism of neurotransmitters and CO₂ and that ions, most sugars, amino acids, nucleotides, vitamins, hormones, and cyclic AMP pass through gap junctions. Apart from coordinating the metabolic activity of cell populations, gap junctions may participate in electrical activities or may amplify the consequences of signal transduction.⁵⁸ The reduction of astrocyte secondary processes observed in this study could involve a reduction of their gap junctions and consequently affect neuronal function.

In the present study, contralateral eyes experienced a significant reduction in the AROA compared with naive eyes. These changes in the astroglia appear to take place without a decrease in RGC number. In a recent parallel study focusing on the effect of OHT in the RGCs of adult SD rats, using a comparable methodology to induce OHT, the number of RGCs of the contralateral eye⁹ proved similar to that in normal adult SD rats.⁵⁹

In conclusion, here we present novel data regarding the AROA in treated and contralateral untreated eyes in relation to IOP levels. The observation of changes in the astroglia of the contralateral eye led us to conclude that the contralateral eye should not be used as a control eye. The reduction of the retinal area occupied by astrocytes and, consequently, of the glial support provided by these cells could be involved in the diminishing numbers of RGCs reported in eyes with ocular hypertension.

Acknowledgments

The authors thank Desirée Contreras and Francisca Vargas for technical assistance and David Nesbitt for correcting the English version of this work.

References

1. Quigley HA. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 1999;18:39–57.
2. Osborne NN, Ugarte M, Chao M, et al. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol.* 1999;43(suppl 1):S102–S128.
3. Vorwerk CK, Gorla MS, Dreyer EB. An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Surv Ophthalmol.* 1999;43(suppl 1):S142–S150.
4. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M. Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol.* 1997;115:497–503.
5. Sugiyama T, Moriya S, Oku H, Azuma I. Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies. *Surv Ophthalmol.* 1995;39(suppl 1):S49–S56.
6. Noske W, Hensen J, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;235: 551–552.
7. Hernandez MR. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19:297–321.
8. Morgan JE. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye.* 2000;14(pt 3B):437–444.
9. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, et al. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res.* 2010;90:168–183.
10. Soto I, Oglesby E, Buckingham BP, et al. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J Neurosci.* 2008; 28:548–561.
11. Zhong YS, Leung CK, Pang CP. Glial cells and glaucomatous neuropathy. *Chin Med J (Engl).* 2007;120:326–335.
12. Bringmann A, Reichenbach A. Role of Müller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001;6:E72–E92.
13. Garcia M, Forster V, Hicks D, Vecino E. Effects of Müller glia on cell survival and neuritegenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3735–3743.
14. Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Triviño A. Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2001;73:601–615.
15. Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Res.* 1996;36:2029–2036.

16. Vernadakis A. Changes in astrocytes with aging. In: Federoff S, Vernadakis A. *Astrocytes*. Orlando: Academic Press; 1986:377-407.
17. Gupta N, Ang LC, Noel de Tilly L, Bidaisee L, Yucel YH. Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:674-678.
18. van Noort JM. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J Mol Med*. 1996;74:285-296.
19. Young RA, Elliott TJ. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*. 1989;59:5-8.
20. Tezel G, Yang X, Luo C, Peng Y, Sun SL, Sun D. Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:705-714.
21. Yang J, Yang P, Tezel G, Patil RV, Hernandez MR, Wax MB. Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:365-371.
22. Tezel G; Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference Working Group. The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:1001-1012.
23. Kanamori A, Nakamura M, Nakanishi Y, Yamada Y, Negi A. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res*. 2005;81:48-56.
24. Moore CG, Milne ST, Morrison JC. Noninvasive measurement of rat intraocular pressure with the Tono-Pen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:363-369.
25. Moore CG, Johnson EC, Morrison JC. Circadian rhythm of intraocular pressure in the rat. *Curr Eye Res*. 1996;15:185-191.
26. Jia L, Cepurna WO, Johnson EC, Morrison JC. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:1380-1385.
27. Krishna R, Mermoud A, Baerveldt G, Minckler DS. Circadian rhythm of intraocular pressure: a rat model. *Ophthalmic Res*. 1995;27:163-167.
28. Drouyer E, Dkhihi-Benyahya O, Chiquet C, et al. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One*. 2008;3:e3931.
29. Ramírez JM, Triviño A, Ramírez AI, Salazar JJ, Garcia-Sanchez J. Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res*. 1994;34:1935-1946.
30. Xue LP, Lu J, Cao Q, Hu S, Ding P, Ling E. Müller glial cells express nestin coupled with glial fibrillary acidic protein in experimentally induced glaucoma in the rat retina. *Neuroscience*. 2006;139:723-732.
31. David JP, Ghazali F, Fallet-Bianco C, et al. Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neurosci Lett*. 1997;235:53-56.
32. Porchet R, Probst A, Bouras C, Draberova E, Draber P, Riederer BM. Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics*. 2003;3:1476-1485.
33. May CA. The optic nerve head region of the aged rat: an immunohistochemical investigation. *Curr Eye Res*. 2003;26:347.
34. Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC, Brosnan CF. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res*. 1992;17:877-885.
35. Romano C, Barrett DA, Li Z, Pestronk A, Wax MB. Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:1968-1975.
36. Kommers T, Rodnight R, Oppelt D, Oliveira D, Wofchuk S. The mGluR stimulating GFAP phosphorylation in immature hippocampal slices has some properties of a group II receptor. *Neuroreport*. 1999;10:2119-2123.
37. Burke JM, Smith JM. Retinal proliferation in response to vitreous hemoglobin or iron. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20:582-592.
38. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25:397-424.
39. Inman DM, Horner PJ. Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*. 2007;55:942-953.
40. Hernandez MR, Pena JD. The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:389-395.
41. Varela HJ, Hernandez MR. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma*. 1997;6:303-313.
42. Bodeutsch N, Siebert H, Dermon C, Thanos S. Unilateral injury to the adult rat optic nerve causes multiple cellular responses in the contralateral site. *J Neurobiol*. 1999;38:116-128.
43. Panagis L, Thanos S, Fischer D, Dermon CR. Unilateral optic nerve crush induces bilateral retinal glial cell proliferation. *Eur J Neurosci*. 2005;21:2305-2309.
44. Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immunoregulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*. 2000;29:293-304.
45. Neufeld AH. Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1999;117:1050-1056.
46. Tezel G, Chauhan BC, LeBlanc RP, Wax MB. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3025-3033.
47. Odoardi F, Kawakami N, Klinkert WE, Wekerle H, Flugel A. Blood-borne soluble protein antigen intensifies T cell activation in autoimmune CNS lesions and exacerbates clinical disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:18625-18630.
48. Donaldson LF, McQueen DS, Seckl JR. Neuropeptide gene expression and capsaicin-sensitive primary afferents: maintenance and spread of adjuvant arthritis in the rat. *J Physiol*. 1995;486(pt 2):473-482.
49. Kelly S, Dunham JP, Donaldson LF. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. *Eur J Neurosci*. 2007;26:935-942.
50. Kolston J, Lisney SJ, Mulholland MN, Passant CD. Transneuronal effects triggered by saphenous nerve injury on one side of a rat are restricted to neurones of the contralateral, homologous nerve. *Neurosci Lett*. 1991;130:187-189.
51. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 1996;114:299-305.
52. Kawasaki A, Otori Y, Barnstable CJ. Müller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:3444-3450.
53. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron*. 2002;35:419-432.
54. Ikui H, Uga S, Kohno T. Electron microscope study on astrocytes in the human retina using ruthenium red. *Ophthalmic Res*. 1976;8:100-110.
55. Zahs KR, Newman EA. Asymmetric gap junctional coupling between glial cells in the rat retina. *Glia*. 1997;20:10-22.
56. Bussow H. The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res*. 1980;206:367-378.
57. Hollander H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling TL, Stone J. Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J Comp Neurol*. 1991;313:587-603.
58. Ramson BR, Ye Z. Gap junctions and hemichannels. In: Ketteman H, Ramson BR. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press; 2005:177-189.
59. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jimenez-Lopez M, et al. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res*. 2009;49:115-126.

Apéndice d

Fisiopatología y progresión de la neurodegeneración glaucomatosa

Gallego B. I.¹, Ramírez A. I.^{1,2},
Salazar J. J.^{1,2}, de Hoz R.^{1,2},
Rojas B.^{1,3}, García-Martín E.S.¹,
Triviño A.^{1,3}, Ramírez J. M.^{1,3}

¹Instituto de Investigaciones
Oftalmológicas Ramón Castroviejo.

²Facultad de Óptica y Optometría.

³Facultad de Medicina.
Universidad Complutense de Madrid.
Madrid.

RESUMEN

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial caracterizada por una disminución irreversible de las CGRs. Entre los principales factores de riesgo se encuentran: la edad, la PIO aumentada, la disregulación vascular y la inflamación. Otros elementos fundamentales en los mecanismos patogénicos son las células gliales y el sistema inmune. Entre las alteraciones secundarias que provocan la muerte de las células ganglionares se encuentran: la neurotoxicidad mediada por glutamato, la privación de neurotrofinas, los radicales libres y el óxido nítrico inducible.

Palabras clave: glaucoma, PIO, inflamación, lámina cribosa, astrogliosis y microglia.

El glaucoma se define como una neuropatía óptica crónica, multifactorial, caracterizada por la pérdida progresiva de los axones de las células ganglionares de la retina (CGRs)^{1,2}. Esta pérdida celular provoca, en la cabeza del nervio óptico, un aumento de la excavación y un adelgazamiento del anillo neuroretiniano; que a su vez se detecta clínicamente por la disminución del campo visual y del espesor de la capa de fibras nerviosas de la retina^{1,2}.

Esta patología puede comenzar por el incremento de la presión intraocular (PIO) o por una disregulación vascular, que provocarán una serie de cambios incipientes como son: la obstrucción del flujo axoplásmico de las CGRs y, alteraciones microvasculares, gliales, del tejido conectivo (a nivel de la lámina cribosa) y del sistema inmune. A su vez estos cambios incipientes serán responsables de causar una serie de daños secundarios, entre los que se incluyen: i) daño excitotóxico, provocado por el glutamato liberado por las neuronas dañadas; ii) privación de neurotrofinas; iii) daño oxidativo, por el exceso de radicales libres y neurotoxicidad, por exceso de óxido nítrico (ON)³. El resultado final será la disfunción y posterior muerte de las CGRs, con la consiguiente pérdida de sus axones hacia el cuerpo geniculado lateral, lo que conduce a la pérdida visual irreversible (Figura 1).

Mecanismos primarios en el daño glaucomatoso

Aumento de la PIO

Existe una relación estrecha entre el aumento de la PIO y la muerte de las CGRs por apoptosis^{4,5}. Sin embargo entre el 30-40% de los pacientes con defectos campimétricos glaucomatosos poseen una PIO normal y son diagnosticados como glaucomas normotensionales^{3,6}. Por lo tanto, la elevación de la PIO es un factor importante pero no el único responsable del daño del nervio óptico.

Correspondencia

José M. Ramírez Sebastián
Instituto de Investigaciones
Oftalmológicas Ramón Castroviejo
Facultad de Medicina Pab. VI – 4ª planta
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid
E-mail: ramirezs@med.ucm.es

Apéndice e

Glia and Blood-retinal Barrier: Effects of Ocular Hypertension

José M. Ramírez, Blanca Rojas, Beatriz I. Gallego

Elena S. García-Martín, Alberto Triviño

Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid, Spain

Ana I. Ramírez, Juan J. Salazar, Rosa de Hoz

Instituto de Investigaciones Oftalmológicas Ramón Castroviejo

Facultad de Óptica y Optometría

Universidad Complutense de Madrid, Spain



1 Introduction

Glaucoma, the second leading cause of blindness in the world, is a multifactorial neurodegenerative disease characterized by an irreversible decrease of retinal-ganglion cells (RCG) of the retina and their axons, the functional impact of which leads to a visual-field loss (Kerrigan-Baumrind, Quigley, Pease, Kerrigan, & Mitchell, 2000; Nork *et al.*, 2000; Quigley, Dunkelberger, & Green, 1989; Quigley, 2001).

Many of the proposed mechanisms in the development and progression of this pathology are linked to increased intraocular pressure (IOP). Although IOP was previously considered a major factor responsible for the glaucomatous neuropathy, today multiple factors are considered to act as the initial insult in glaucomatous atrophy. This initial damage leads to a retinal-ganglion-cell injury. Secondary insults such as glutamate excitotoxicity and oxidative stress exacerbates the dysfunction, leading to the death of RGCs (Kaushik, Pandav, & Ram, 2003). Growing evidence in clinical and experimental studies strongly suggests the involvement of the immune system in glaucoma, supporting the idea that both innate and adaptive immune responses accompany glaucomatous neurodegeneration (Tezel *et al.*, 2007; Tezel & Wax, 2007; Tezel, 2013; Wax & Tezel, 2002; Yang *et al.*, 2001).

It is generally accepted that glaucomatous damage is a consequence of axonal degeneration that ends with the death of ganglion cells, recent studies have shown the importance of glia in the pathogenic mechanism of the disease (Hernandez *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2009; Newman, 2004; Prasanna *et al.*, Krishnamoorthy, & Yorio, 2011; Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009).

Under normal conditions, astrocytes and Müller glia in the retina and in the optic nerve make contact with retinal neurons, providing stability to the neural tissue (Ramírez *et al.*, 1996). Physiological studies have demonstrated that both cell populations perform equivalent functions, including: neurovascular coupling, storing glycogen, providing glucose to neurons, regulating the levels of extracellular potassium, playing a major role in the regulation and metabolism of neurotransmitters such as GABA, helping to remove CO₂ from the retina, and helping to the maintenance of water homeostasis in the retina (Bringmann *et al.*, 2006; Kimelberg & Nedergaard, 2010; Kumpulainen, *et al.*, 1983; Nag, 2011; Newman, 2004; Sofroniew & Vinters, 2010). Furthermore, astrocytes as well as Müller cells can induce and maintain blood-retinal barrier (BRB) properties within the vascular endothelial cells (Tout *et al.*, 1993).

Microglial cells are considered the resident macrophages of the central nervous system (CNS) and are involved in defence mechanisms against the destructive environment in addition to being able to facilitate regenerative processes. Microglia cells are responsible for the phagocytosis of cell debris resulting from apoptosis and normal death and have the capacity to surround damaged neurons and participate in synaptic stripping. In addition, these cells could provide trophic support to neurons and release anti-inflammatory molecules to enhance the survival of surrounding neurons (Elkabes *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2004).

Despite the lack of clear evidence supporting classical hallmarks of inflammation in glaucoma, glial cells from the retina and the optic nerve in the glaucomatous optic neuropathy show a chronic activation (Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009), a situation that is commonly accepted as a sign of neuroinflammation in the CNS.

Under normal conditions, the retina, as a part of the CNS, does not prompt an immunological rejection reaction due to an immune privilege that allows tissue to survive. To preserve this immune privilege, under pathological conditions, glial cells need to be capable of responding rapidly to any damage

and consequently become activated (Tezel *et al.*, 2007). Microglial cells play fundamental roles in local immune responses and immunosurveillance. On the other hand, astrocytes are involved in maintaining the integrity of the blood-brain barrier (BBB), thus preserving the CNS immune privilege. The BBB, composed of endothelial cells, pericytes, and macroglial cells, represents both a physical and a functional separation of circulating blood components from the CNS. This barrier restricts the diffusion of some damaging molecules that could alter the nerve-tissue integrity and allow the active transport of other metabolic products and substances. In the retina this barrier is called blood-retinal barrier (BRB), which under pathological conditions could be altered, leading to a loss of the immune privilege.

Both the microglia and the astrocytes are able to protect neurons from potentially damaging effects of an inflammatory immune response (Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009). An initial immunological response to the CNS injury is possibly associated with cleaning and tissue repair, but an inappropriate immune response could be involved in several autoimmune diseases, perhaps finally being a harmful response against the CNS.

The continuous nature of glial activation in the glaucomatous retina and optic-nerve head therefore appears to be crucial in determining the outcome of an immune response as being neurodestructive rather than neurosupportive to RGCs (Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009). It has been suggested that early, moderate, and transient well-controlled activation of local glia correlate with protective immunity in the injured CNS by providing tissue cleaning and tissue repair. However, the widespread and persistent nature of glial activation in glaucomatous human eyes may lead to tissue damage through proinflammatory cytokines, facilitating the progression of RGC neurodegeneration in the glaucomatous eyes (Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009). This would support the contention that, as resident immunoregulatory cells, glia have the potential to start the stimulation of an immune response during glaucomatous neurodegeneration and therefore a secondary autoimmune component may be involved in this neurodegenerative injury (Tezel, 2013).

Resident glia alter their gene-expression profile during activation (Bosco *et al.*, 2011). Glial response in glaucomatous eyes reportedly involves the activation of a glial immunoregulatory function and antigen-presenting ability (Steele *et al.*, 2006). Glial cells are capable of producing numerous immune mediators in human glaucoma and in animal models of the disease (Johnson *et al.*, 2007; Kompass *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2010; Panagis *et al.*, 2011; Steele *et al.*, 2006; Tezel *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). In glaucomatous patients, an upregulation of TNF- α (Tezel *et al.*, 2001) and other proinflammatory cytokines has been demonstrated (Kuchtey *et al.*, 2010). In addition, the involvement of different complement components (Kuehn *et al.*, 2006; Stasi *et al.*, 2006), the presence of an abnormal subset of T cells (Yang *et al.*, 2001), an increase of the titres of serum auto-antibodies (Dervan *et al.*, 2010; Joachim *et al.*, 2008), and an increased expression of glial MHC class II molecules have been detected in human glaucoma (Yang *et al.*, 2001).

MHC class-II molecules are critical to start the specific immune response and are confined to professional antigen-presenting cells (APCs). In the healthy CNS parenchyma, MHC-II molecules are not constitutively expressed in neural cells but, in an environment rich in inflammatory cytokines, of which interferon- γ (IFN- γ) is the most potent (Holling *et al.*, 2004), MHC II expression can be induced in non-professional APCs.

Human and animal studies have demonstrated that in the retina and optic nerve the expression of MHC II in glial cells is minimal or absent and, when present, is restricted to some microglia (Aloisi,

2001; Gallego *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 1987) and a few astrocytes (Gallego *et al.*, 2012). However, a significant correlation has been established between glaucomatous disease progression and MHC class-II expression by resident cells of the organ involved (Tezel *et al.*, 2007). Under virtually all inflammatory and neurodegenerative diseases, microglia have been shown to upregulate MHC class-II expression and MHC class-II⁺ astrocytes, and Müller cells have been detected (Crish & Calkins, 2011).

2 Anatomy of the Retina

2.1 Retinal Cell Layers

The primary function of the retina is to convert light into nerve impulses which are transferred to the brain via the optic nerve. The retina comprises the retinal pigment epithelium (RPE) and the neurosensory retina, the latter containing neurons, glial cells, and components of the vascular system. Various types of neurons are present, such as: photoreceptors, bipolar cells, ganglion cells, amacrine cells, and horizontal cells (Hogan *et al.*, 1971) (Fig.1).

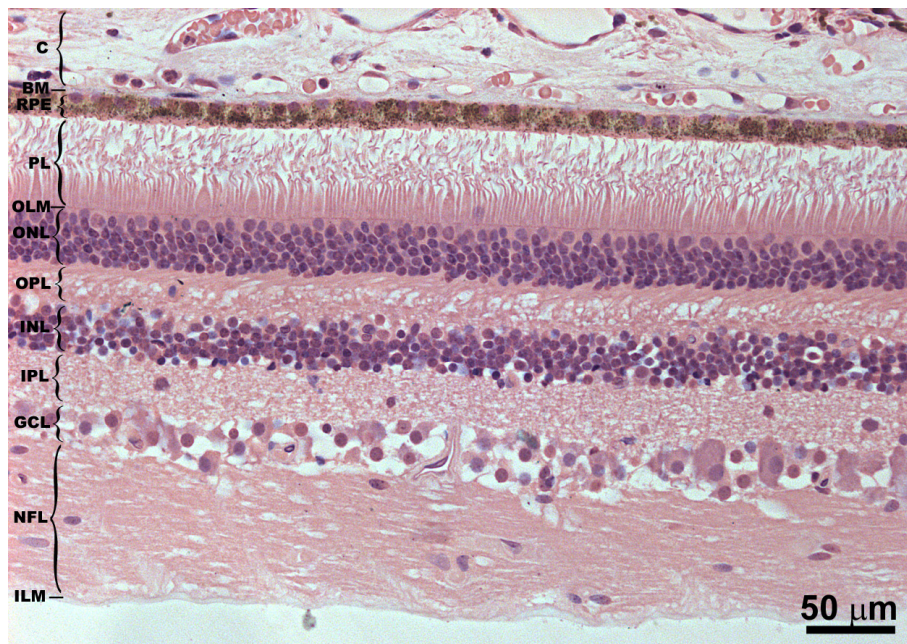


Figure 1: Histological section of the human retina. Hematoxylin/eosin. C: Choroid; BM: Bruch's membrane; RPE: retinal pigment epithelium; PL: photoreceptor layer; OLM: outer limiting membrane; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; INL: inner nuclear layer; IPL: inner plexiform layer; GCL: ganglion-cell layer; NFL: nerve-fibre layer; ILM: inner limiting membrane.

The coding function of the retina depends not only on photoreceptors but also on neurons, glial cells, and RPE, which amplify the signal (Fourgeux *et al.*, 2011). Photoreceptors are cells that capture light and are situated at the most external side of the neurosensory retina, in the vicinity of the RPE. The-

se cells are of two types: rods (for scotopic vision) and cones (for photopic vision) (Hogan *et al.*, 1971). The photoreceptors can convert light photons into an electrical signal because they contain a photopigment in their outer segments. These segments consist of a stack of disk membranes that are synthesised in the proximal portion of the outer segment and shed at its apical size (Fourgeux *et al.*, 2011). Photoreceptors form contacts with horizontal and bipolar cells in the outer plexiform layer (OPL). Coupling between neighbouring rods and cones in OPL allows the first stage of visual processing. The inner nuclear layer (INL) contains cell bodies of Müller glial, bipolar, amacrine, and horizontal cells. The inner plexiform layer (IPL) consists of a synaptic connections between the axons of bipolar cells and dendrites of ganglion and amacrine cells. The retinal ganglion cell layer (GCL) contains the cell bodies of retinal ganglion cells, certain displaced amacrine cells, and astrocytes. Inside the eye, ganglion-cell axons run along the retinal surface towards the optic-nerve head forming the nerve fibre layer (NFL) (Fourgeux *et al.*, 2011; Sharma, 2007) (Fig. 1).

2.2 Retinal Macroglial Cells

The neural retina also contains two types of macroglial cells: Müller cells and astrocytes (Fig. 2). Müller cells are long, radially oriented cells which span the width of the neural retina from the outer limiting membrane (OLM), where their apical ends are located, to the inner limiting membrane (INL), where their basal endfeet terminate. In the nuclear layers, the lamellar processes of the Müller cells can be seen to form basket-like structures which enclose the cell bodies of photoreceptors and neural cells. In plexiform layers, fine processes of these cells are interwoven between the synaptic processes of neural cells. In both the plexiform and nuclear layers, Müller cell processes cover most but not all of the neural surfaces (Newman, 1986).

Astrocytes are located mainly in the NFL and GCL in most mammals (e.g. human [Fig. 2], rabbit, rats and mouse) (Gallego *et al.*; Ramírez *et al.*, 1994; Triviño *et al.*, 1997). Astrocyte morphology differs between species. In humans, two types of astrocytes can be distinguished: elongated (located in the NFL) (Fig. 2A) and star-shaped (located in GCL) astrocytes (Fig. 2B). In mice (Fig. 8) and rats the astrocytes are star-shaped.

Macroglial cells perform various essential roles for the normal physiology of the retina, maintaining a close and permanent relationship with the neurons (Ramírez *et al.*, 1998) (Fig. 3). Thus every aspect of the development, homeostasis, and function of the visual system involves a neuron-glia partnership. Glial cells insulate neurons, provide physical support for them, and supplement them with several metabolites and growth factors. These cells are also important in axon guidance and the control of synaptogenesis (Pfrieger, 2002; 2003). Under normal conditions, astrocytes and Müller cells maintain the homeostasis of extracellular ions, glucose, and other metabolites, water, pH and neurotransmitters such as glutamate and GABA (Johnson & Morrison, 2009). These cells also produce a great quantity of cytokines and growth factors (basic fibroblast growth factor (bFGF), transformation growth factor beta (TGF- β), and neuronal-survival growth factor such as the nerve growth factor (NGF) (Pena *et al.*, 1999; 2001)), which may contribute both to neurotoxic as well as to neuroprotective effects. In addition, they produce laminin, fibronectin, and tropoelastin, the precursor of elastin (Pena *et al.*, 2001). It has also been demonstrated that macroglial cells are more resistant to oxidative damage than are neurons, this characteristic protecting them against such damage. This potential is due to the fact that these cells contain high concentrations of antioxidants such as reduced glutathione and vitamin (Wilson, 1997). Consequently, a depression of these cellular activities could lead to neuronal dysfunction (Triviño *et al.*, 2005).

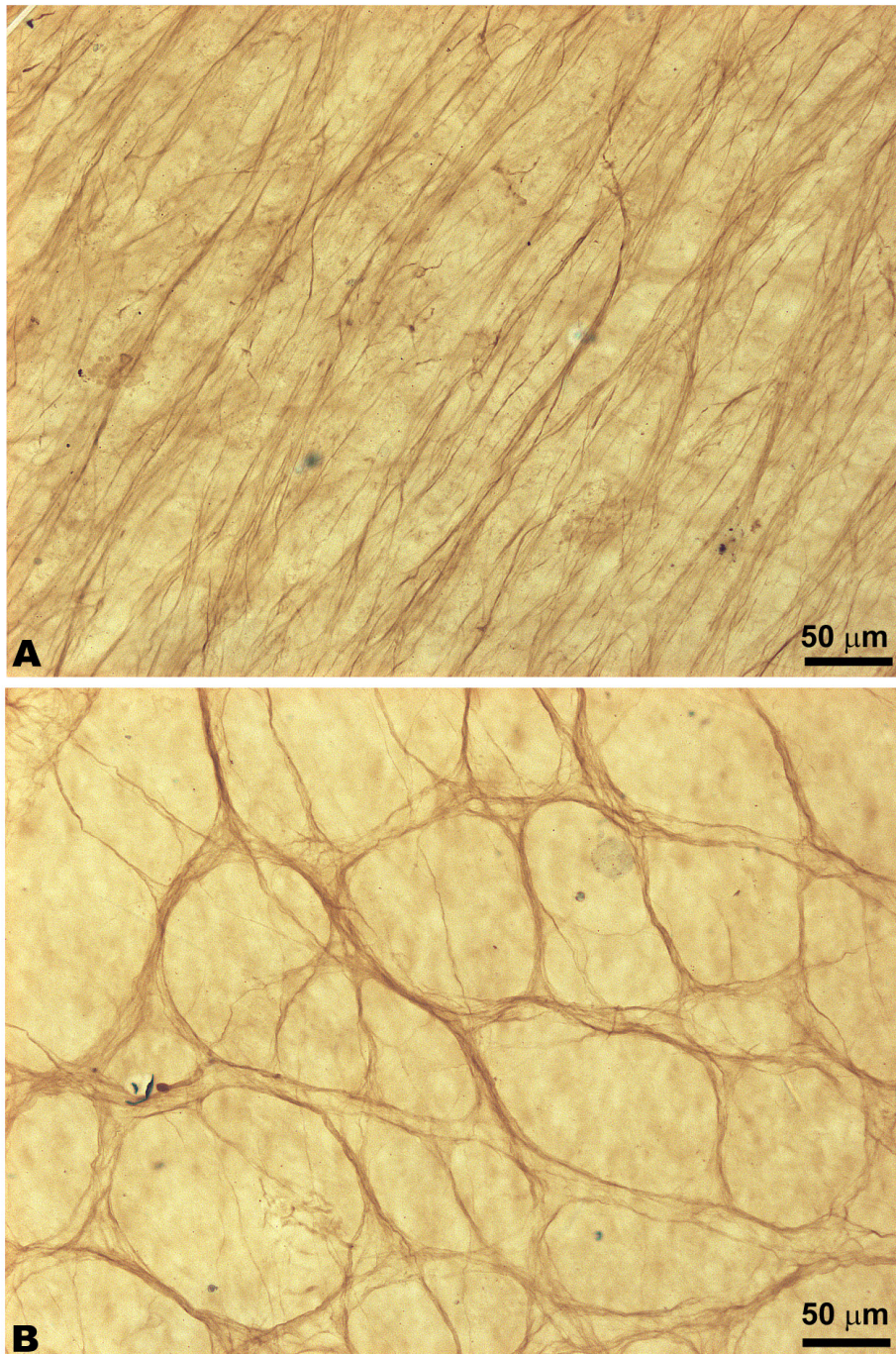


Figure 2: Astrocytes on the nerve-fibre-RCG layer of the human retina. Immunohistochemistry, anti-GFAP. Retinal whole-mount. A. In the NFL, the astrocytes form astroglial bundles parallel to the ganglion cell axons. B. In the GCL astrocytes form a homogeneous honeycomb plexus constituted by stellate cells.

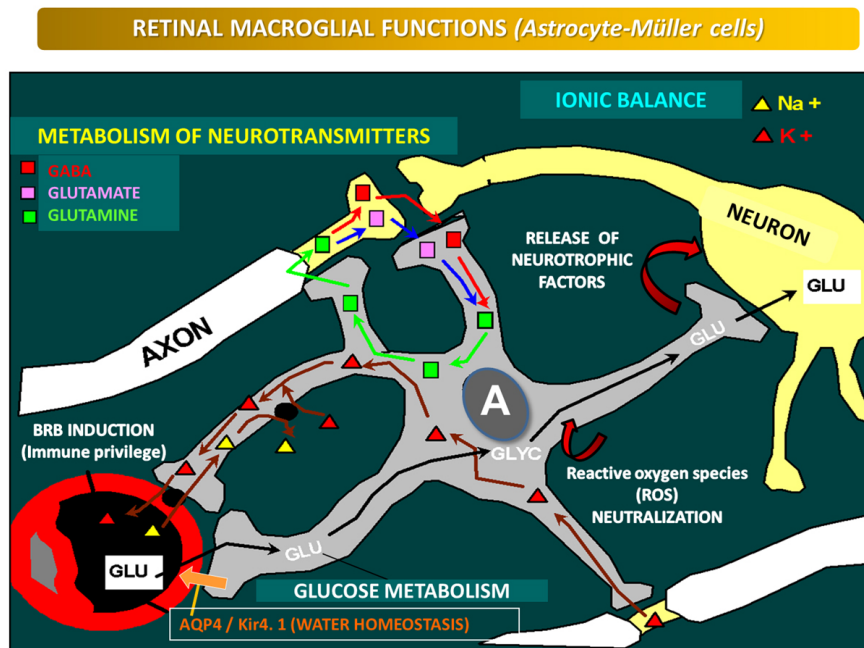


Figure 3: Scheme illustrating the links between the macroglia, the blood-retinal barrier and retinal neurons.

Macroglial cells induce the properties of barrier in the retinal capillaries (the BRB) (Abbott *et al.*, 2006; Tout *et al.*, 1993), as they release substances that stabilize the close tight junctions between endothelial vascular cells (Tout *et al.*, 1993), securing immune privilege to protect neurons from potentially damaging effects of an inflammatory immune response. Finally, glial cells play fundamental roles in local immune responses and immunosurveillance (Aloisi, 2001; Dong & Benveniste, 2001).

Macroglial cells also take part in pathological processes in the CNS. Glial cells in the CNS have been implicated in the pathological course of neuronal damage after mechanical, ischaemic, and various other insults. Glial-cell activation is a hallmark of CNS injury, characterized by an increase in size and number of glial cells and upregulation of GFAP, with additional cellular changes that may cause or relieve neuronal impairment. These reactive cells also have higher metabolic activity (Ames, 2000). After injury, reactive glial cells participate in the formation of a glial scar, in which there is an accumulation of enlarged astrocyte bodies and a thick network of processes with increased expression of GFAP and vimentin. Macroglial cells become reactive in response to a wide variety of stimuli, including inflammation as well as oxidative and mechanical stress (Zhong *et al.*, 2007).

2.3 Retinal Vascularization

Retinal vasculature is mostly a bi-layered system, i.e. a superficial network (Fig. 4) and a deep capillary plexus; however, there are multiple layers of capillaries in the peripapillary region, known as the radial peripapillary capillaries (Ryan *et al.*, 2013). The inner retinal layers have their own blood supply coming from the blood vessels entering the retina at the optic-nerve head (Fig. 4), while the outer retina is supplied only by the choroidal vasculature (Fig. 5). The retinal vascularization is supplied by the central reti-

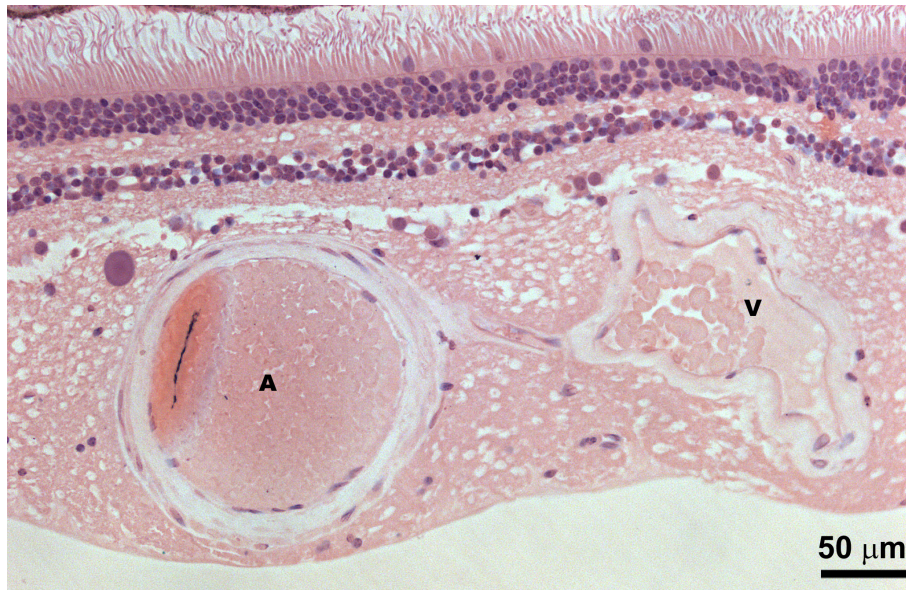


Figure 4: Histological section of the human retina. Retinal vessels. Hematoxylin/eosin. Microphotography of an arteriole (A) and a venule (V) of the superficial vascular network in the nerve fiber layer.

na artery and has an end-arterial hierarchy: arteries branch to arterioles, which supply a capillary network that is drained by venules, and then veins remove the blood from the retina (Ryan *et al.*, 2013) (Fig. 4). Capillaries have a lumen diameter of 3.5 to 6 μm and perivascular pericytes. The retina has the highest endothelial cell-to-pericyte ratio in the body, 1:1 (Cogan & Kuwabara, 1967).

The choroidal vasculature provides oxygen and nutrients to the photoreceptors via the choriocapillaris. The choriocapillaris is made up of capillaries situated between the medium-sized vessel layer (Sattler's layer) and Bruch's membrane (Fig. 5). This array of these capillaries, flattened and elliptical in transverse section, creates a large surface for metabolic exchange with the retina. With the same purpose, the vessels of the choriocapillaris are composed of tubes of endothelial cells (EC) and pericytes that do not completely surround it, appearing only towards the scleral side. Meanwhile, the ratio of pericytes:endothelial cells in the choriocapillaris is 1:6 (Bron *et al.*, 1997). Given the contractile nature of these cells, which enables the blood supply to be regulated in other tissues, their lower number in the choriocapillaris could suggest that the regulation of the choroidal blood flow is regulated by the autonomic nervous system (Bill, 1975) and the contribution of pericyte contraction is practically nil (Bron *et al.*, 1997).

The EC presents fenestrations in the side oriented towards Bruch's membrane and RPE (Melamed *et al.*, 1980; Spitznas, 1974; Spitznas & Reale, 1975). These fenestrations are of great physiological importance, as they permit the passage of nutrients towards the retina. The choroid capillaries are permeable to small molecules such as glucose (20-fold more than in cardiac muscle and 80-fold more than in skeletal muscle) (Bill *et al.*, 1980) and amino acids (Törnquist, 1979), as well as large molecules such as γ -immunoglobulin and vitamin A (Bill, 1975; 1980; 1983).

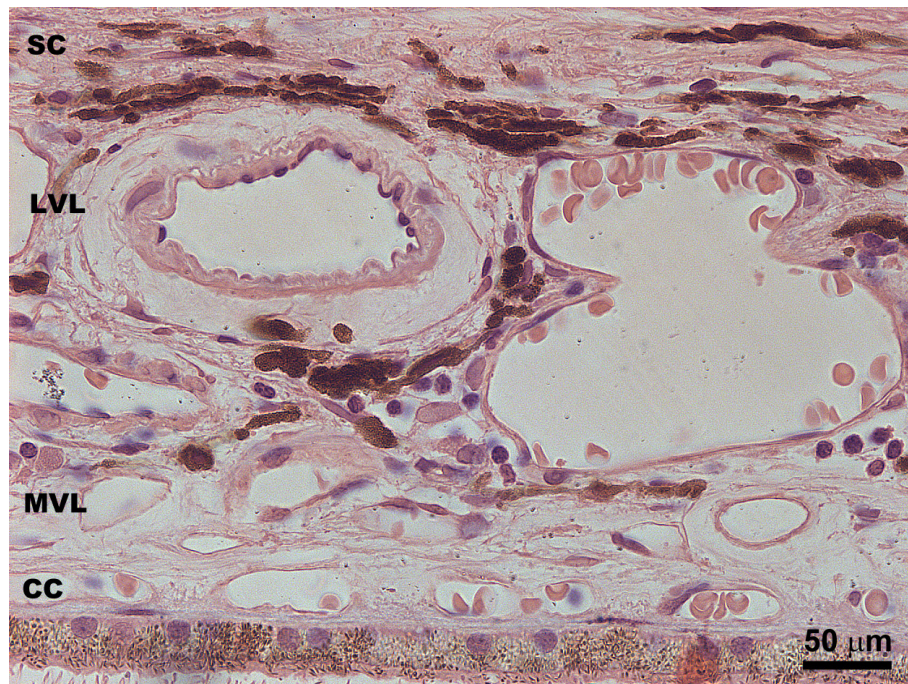


Figure 5: Histological section of the human choroid. Hematoxylin/eosin. SC: suprachoroid; LVL: large-size vessel layer; MVL: medium-size vessel layer; CC: choriocapillary.

2.4 Blood-retinal barriers

The retina is physiologically and immunologically segregated from the rest of the body by tight junctions between vascular endothelial cells (inner BRB) and RPE cells (outer BRB). This situation is responsible for intraocular tissue to be an immune-privileged site, thus protecting the eye from the innocent-bystander effect of inflammation (Sharma, 2007). In addition, only small molecules can cross these barriers, making it difficult for many drugs to reach ocular tissue. Astrocytes and Müller cells induce the BRB (Janzer & Raff, 1987). Retinal capillaries are closely ensheathed by glial processes. Usually, Müller cells enhance the barrier function of vascular endothelia by the secretion of factors such as PEDF, thrombospondin-1, and glial-cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Eichler *et al.*, 2004; Nishikiori *et al.*, 2007). However, in response to hypoxia, inflammation, or glucose deprivation, Müller cells produce factors such as vascular endothelial-growth factor (VEGF) and tumour-necrosis factor, which increase vascular permeability (Aiello *et al.*, 1995; Eichler *et al.*, 2004; Noda *et al.*, 2005). Müller cells are also a source of matrix metalloproteinases (Behzadian *et al.*, 2001; Noda *et al.*, 2005) which degrade the tight-junction protein, occludin (Giebel *et al.*, 2005).

3 Immune Privilege of the Eye

Immune privilege is the condition in which selected immune responses are suppressed or excluded in certain organs. Immune privilege is well developed in three regions of the body: the eye, the brain and the pregnant uterus (Niederhorn, 2006). Immune privilege was first described by Peter Medawar in his

study of allogenic skin grafts placed heterotopically in the anterior chamber of the eye and into the brains of rabbits (Medawar, 1948). Immune privilege is a property of certain tissues in which immune responses to foreign antigens, particularly alloantigens are suppressed, and even completely inhibited. It is widely believed that immune privilege is an adaptation for reducing immune-mediated injury to cells that have limited or no capacity for regeneration (Niederhorn & Stein-Streilein, 2010). Immune privilege normally serves as a homeostatic mechanism that preserves normal function in tissues, particularly those that are highly specialized or have limited capacity for renewal, such as the eye and brain (Forrester, 2013). In the eye, immune privilege was described over 130 years ago, but its significance was not appreciated until the early 1950s. Investigations beginning in the 1970s ushered in a new era, revealing that ocular immune privilege is due to anatomical, physiological, and immunoregulatory processes that prevent the induction and expression of immune-mediated inflammation (Niederhorn & Stein-Streilein, 2010).

In the eye, immune privilege promotes the survival of intraocular tumour grafts by inhibiting both adaptive and innate immune effectors (Streilein, 2003), whereas such grafts at conventional body sites leads to acute, irreversible immune rejection (Ohta *et al.*, 1999). To achieve immune privilege, the eye and the immune system use several different but related strategies that prevent or alter innate and adaptive immune responses in eyes: immunological ignorance, peripheral tolerance of eye-derived antigens, and the development of an intraocular immunosuppressive microenvironment (Streilein, 2003). By limiting intraocular inflammation, immune privilege preserves the integrity of the visual axis and thereby prevents blindness (Ohta *et al.*, 1999). Visual axis integrity is essential to focus light images precisely on the retina. Another important advantage of ocular immune privilege is that certain cells components of the eyes (corneal endothelium and neurosensory retina) are incapable of replication and cannot regenerate after injury and loss after destructive inflammation (Streilein, 2003). The anterior chamber, the vitreous cavity, and the subretinal space are immune-privileged ocular compartments (Jiang *et al.*, 1993; Niederhorn *et al.*, 1981; Wenkel, *et al.*, 1999). In addition, certain ocular tissues function as immune-privileged sites. This is true of the cornea (Hori *et al.*, 2000), RPE (Wenkel & Streilein, 2000), and the neuronal retina (Streilein *et al.*, 2002).

It is becoming increasingly clear that immune privilege is not aimed at entirely suppressing immune responses in the target organ, but rather at maintaining a specialized, tightly regulated immunological niche to preserve the integrity of especially vulnerable organs, such as the brain and the eye (Niederhorn, 2006; Streilein, 2003). In contrast to the previous view that immune privilege is maintained by immune-cell exclusion, it is now increasingly accepted that the privileged status is preserved by local active mechanisms that suppress responses to antigens within the privileged tissues (Niederhorn & Stein-Streilein, 2010). In the eye, one such mechanism is anterior-chamber-associated immunodeviation (ACAID) (Streilein, 1987). The systemic unresponsiveness elicited by introducing antigens in the anterior chamber of the eye was first reported by Kaplan *et al.* in 1975. ACAID was defined as an antigen-specific, stereotypic, deviant systemic immune response in which the effectors of Th1-type immunogenic inflammation (T cells that mediate delayed hypersensitivity and B cells that secrete complement-fixing antibodies) (Coffman *et al.*, 1988) are selectively deficient (Niederhorn, 1990; Niederhorn, 2002; Streilein, 1987; Wilbanks & Streilein, 1990). We know now that ACAID results in the activation of an altered antibody response with T-cell suppression of the Th1 and Th2 responses (Katagiri *et al.*, 2002). Other mechanisms that contributed to maintaining the immune-privileged state of the eye include the re-

duced expression of MHC molecules on ocular cells, and the existence of an intraocular anti-inflammatory environment (Benhar *et al.*, 2012).

Immune privilege is mediated by both active and passive mechanisms (Streilein, 2003). The eye is privileged in part because of the blood-ocular barriers that include the iris, ciliary body, and retinal-pigment epithelium as well as the retinal vasculature (Qiao *et al.*, 2009). Because blood-ocular barriers are not completely impermeable, innate and adaptive immune cells and molecules can still gain access to the internal compartments of the eye. In response to this threat to vision, the eye has soluble and cell-surface immunomodulatory and anti-inflammatory factors in ocular fluids and on parenchymal cell surfaces (Qiao *et al.*, 2009). Thus, the aqueous humour contains vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin, α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), calcitonin gene-related peptide (CGRP), macrophage migration inflammatory factor (MIF), the mediator of apoptosis Fas ligand (CD95L), and TGF- β 2 (Streilein, 2003). Ocular parenchymal cells expressing molecules that can modulate immune effector mechanisms include the cornea, retinal-pigment epithelium, and iris. Among the cell-surface molecules that promote ocular IP are CD95L, inhibitors of the complement (CD46, CD55, CD59, and complement receptor-related protein, Crry) the immune co-stimulator B7-2 (Cd86) or the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) (Streilein, 2003).

Although the eye is an immunoprivileged site and has mechanisms to interfere the development of immune inflammation, under certain pathological conditions, ocular immune privilege is terminated and severe inflammation occurs (Niederhorn, 2006; Streilein, 2003). This process contributes to the pathogenesis of many ocular diseases (Qiao *et al.*, 2009).

4 Glaucomatous Optic Neuropathy

This pathology may begin by an increase in intraocular pressure (IOP) or by a vascular dysregulation, which would provoke a series of incipient changes, such as: the obstruction of the axoplasmic flow of the RGCs, microvascular and glial alterations, and disturbances of the connective tissue (at the level of the lamina cribrosa) and the immune system. In turn, these incipient changes would bring about a number of secondary problems, including: 1) excitotoxic damage, provoked by the glutamate released by the injured neurons; 2) neurotrophin deprivation; 3) oxidative damage, for the excess of free radicals; and 4) neurotoxicity, for the excess of nitrous oxide (NO) (Agarwal *et al.*, 2009). The overall result will be the dysfunction and subsequent death of the RGCs with the subsequent loss of their axons towards the lateral geniculate body, which ultimately leads to the irreversible loss of vision.

4.1 Risk Factors and Physiopathological Mechanisms

4.1.1 Increase in the IOP

There is a close relationship between the increase in the IOP and the death of RGCs by apoptosis (Quigley *et al.*, 1989; Quigley, 1999). However, between 30 and 40% of the patients with glaucomatous visual field defects have a normal IOP and are diagnosed as normotensional glaucomas (Agarwal *et al.*, 2009; Caprioli & Spaeth, 1985). Therefore, the rise in the IOP is an important factor but not the only one responsible for damaging the optic nerve.

The axons of the RGC exit the eye posteriorly through the lamina cribrosa (LC), the site where the

main damage to the axons of the RGCs occurs in glaucoma (Fig. 6). The LC is a structure of porous connective tissue composed of lamellas cribiformes through which the bundles of axons leave the eyeball (Fig. 2) (Salazar, 1994). It has two components, the cellular one and extracellular matrix (ECM). The ECM is composed of specific macromolecules assembled to provide strength, flexibility, and elasticity to the tissue. Among its components, different types of collagen (I, III, IV, V, and VI), elastin, proteoglycans, hyaluronic acid, integrins, and laminin can be distinguished (Elkington *et al.*, 1990; Hernandez *et al.*, 1991). The cell component is constituted by astrocytes, which coat the cribiforme pores and that provide the metabolic support, contribute to the maintenance of the extracellular environment, and confront mechanical and ischaemic damage (Triviño *et al.*, 1996). Also, there are other types of cells such as fibroblasts and microglial cells (Salazar, 1994).

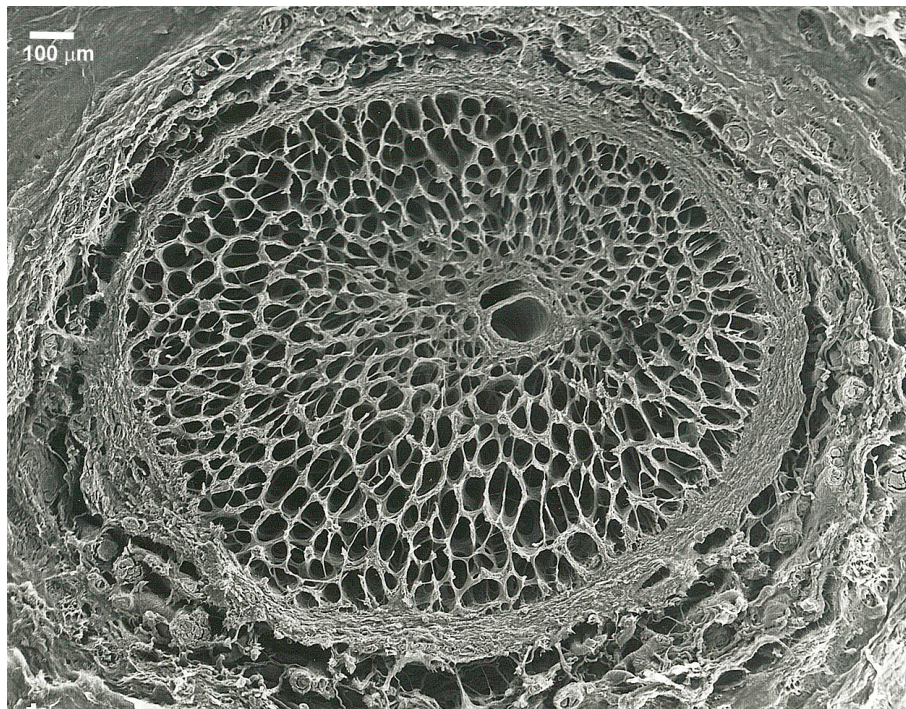


Figure 6: Human lamina cribosa. Scanning electron microscopy of trypsin digested nervous tissue.

The arteries supplying the eye have a relatively high blood pressure. At the origin of the retina and ciliary arteries, blood pressure is about 65-70 mmHg (Neetens, 1979). There is a direct relationship between vessel caliber and pressure of intraocular vessels. The drop in the pressure from the small arteries and arterioles to the capillaries is greater in the choroid than in the retina (Weigelin, 1972). It is well known that a watershed zone, as an area of poor vascularity, is most vulnerable to ischemia (Hayreh, 1990). The vascularization of the LC depends on the Zinn-Haller circle (branches of the posterior ciliary arteries). The posterior ciliary arteries are end-arteries, so they have a watershed zone between them; an issue that could increase the vulnerability of the LC to decreases in blood flow. The LC is an area of biomechanical interest since a discontinuity occurs there in the corneal-scleral cover, this being a weak

point in the mechanical load systems and therefore a site where tension or stress concentrates (Sigal *et al.*, 2010).

Higher IOP can act mechanically in the eye tissues, causing deformations and stress, which augment or abate depending on the geometry and the material properties of each eye. When the levels of stress and tension exceed the physiological tolerance of the tissue cells, these induce a remodelling of the connective tissue (increased production or elimination of collagen and elastin), in an attempt to re-establish mechanical homeostasis (Downs *et al.*, 2011; Grytz *et al.*, 2011). This increase in connective tissue could seriously alter the blood flow by compression, and therefore the nutrition in this laminar region. It should be taken into account that all this could occur with IOP within the normal range in eyes that are particularly susceptible to the stress related to IOP (Grytz *et al.*, 2012; Sigal *et al.*, 2012).

IOP-related alterations in connective tissue may cause the most anterior cribiforme lamellae to give way or be destroyed, thereby transferring the load (weight) to adjacent lamellae in a cascade of damage that, together with the loss of axons, helps provoking glaucomatous excavation (Burgoyne, 2011; Downs *et al.*, 2011; Sigal, 2009; Sigal *et al.*, 2010; 2012).

As stated above, the mechanical stress generated by the IOP causes the reactivation of the astrocytes, the main cells of the optic-nerve head, prompting a remodelling of the ECM (Hernandez, 2000; Morgan, 2000; Varela & Hernandez, 1997). The integrins would act as mechanosensors intercommunicating the astrocytes with the ECM (Morrison, 2006). During this remodelling, type IV and VI collagens increase (the former type being a constituent of the basal astrocyte membrane) which modifies the original structure of the cribiforme pores (Hernandez *et al.*, 2008). Furthermore, the proteoglycans and glycosaminoglycans are altered and the elastic fibres degenerate (Morrison, 2006). All this leads to the biochemical change of the tissue described above.

The ECM is also responsible for providing adhesion signals to control the cell functions and cell survival. Reactive astrocytes increase the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) (Agapova *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2000), enzymes involved in the remodelling of the ECM, in such a way that they can degrade the cell-adhesion molecules to permit cell mobility. On the other hand, the changes in the specific components of the ECM (greater MMP-9, laminina loss, etc.) can interrupt cell-cell and cell-ECM interactions, which in turn could, in the case of the RGCs, provoke cell death by apoptosis (Agarwal *et al.*, 2009).

Because of the deformation, mechanical stress, and the subsequent increased collagen in the LC, the axons may also undergo deformation and mechanical stress on passing through the pores of the LC. This can trigger mitochondrial dysfunction, depressing energy production and blocking axonal transport of molecules (Crish & Calkins, 2011), including neurotrophic factors (such as BDNF), which originate in the brain and are transported towards the soma of the RGCs (Crish *et al.*, 2013; Quigley, 1999). These factors, important for the regulation of the metabolism and for cell survival, if diminished, could lead to the progressive death of the RGCs by apoptosis (Nickells, 1996). This would be considered one of the first events to induce apoptosis of the RGCs.

4.1.2 Alteration of Ocular Blood Flow

In healthy eyes, the retina and the optic-nerve head require a constant blood flow to maintain their high metabolic needs. On the contrary, patients with glaucoma generally suffer reduced ocular blood flow (Flammer *et al.*, 2002; Satilmis *et al.*, 2003). However, the restricted flow reportedly leads to optic atrophy (as occurs in other pathologies) but not to glaucomatous damage. Therefore, the connection between

glaucoma and blood flow would not therefore be the diminished flow but rather its instability, which inflicts repetitive damage of ischaemia-reperfusion (Flammer & Mozaffarieh, 2007). There is a relation between the progressive glaucomatous damage and the fluctuations in the IOP, the drops in blood pressure, and the alterations of self-regulation (e.g. in the primary vascular dysregulation syndrome) (Martínez, 2013; Martinez & Sanchez, 2005; Siesky *et al.*, 2012).

The severe decrease in blood flow to a tissue or organ causes an infarction (which may be due to an inflammation of the vessels or to atherosclerosis). If the flow reduction is not so severe and is reversible, damage occurs by ischaemia-reperfusion (Flammer & Mozaffarieh, 2007). The absence of oxygen and nutrients in a tissue create conditions in which the re-establishment of circulation provokes inflammation and oxidative damage instead of restoring normal functioning. An example of this situation is the release of inflammatory factors, such as interleukins or free radicals, by white blood cells which arrive again to the tissue. In addition, the entry of oxygen, when the blood flow is restored, can cause the formation of reactive oxygen species that can damage proteins and/or lipids and therefore the plasma membrane. This cell damage induces the release of more free radicals (Karageuzyan, 2005). In the optic-nerve head the ischaemia-reperfusion lead to a repeated mild reperfusion injury (Flammer & Mozaffarieh, 2007).

In glaucoma patients, high concentrations of MMP-9 and ET-1 have been recorded in plasma (Cellini *et al.*, 2012; Emre *et al.*, 2005; Flammer *et al.*, 2001). Both molecules can spread from the choroid to the optic-nerve head and provoke vasoconstriction (ET-1) (Rader *et al.*, 1994) as well as the weakening of the secondary BRB with proteolytic degradation (MMP-9) (Grieshaber & Flammer, 2007). This latter repercussion, in extreme situations, leads to splinter hemorrhages (Grieshaber *et al.*, 2006), which appear in some glaucoma patients. The increase in ET-1 provokes another series of alterations related to glaucoma (Good & Kahook, 2010; Prasanna *et al.*, 2011), such as: the remodelling of the extracellular matrix (ET-1 increases the expression of MMPs and their inhibitors), the alteration in the anterograde axonal transport, or astrogliosis (ET-1 is a powerful glial mitogen). Also, the episodes of ischaemia reperfusion activate macroglial cells, both in the retina (astrocytes and Müller glia) as well as the optic-nerve head (Prasanna *et al.*, 2002), resulting in the tissue changes discussed below.

4.1.3 Participation of Glial Cells in Glaucomatous Damage

The macroglial cells of the retina (astrocytes and Müller glia) and the optic nerve (astrocytes, one of the most numerous cell types in the optic-nerve head) fulfil key functions for the maintenance and survival of both tissues and therefore of the RGCs (Ramirez *et al.*, 1996).

In the case of damage, as with glaucoma (mechanical stress, ischaemia-reperfusion), the astrocytes and the Müller glia become reactive, characterized generally by hypertrophy, hyperplasia, and increased expression of gliofibrillary acid protein (GFAP) (Hernandez & Pena, 1997; Hernandez, 2000; Inman & Horner, 2007). In an effort to limit the lesion and promote the reparation of the tissue in the glaucomatous eyes, the moderate and transitory activation of the glial cells can have a protective function through the supply of certain metabolites, growth factors such as BDNF, ciliary neurotrophic factor (CNTF) or the pigment epithelium-derived factor from the retina (PEDF), the expression of antiapoptotic proteins (e.g. BCL-2) and other anti-inflammatory substances, as well as the elimination of neurotoxic substances of the environment (e.g. glutamate) (Johnson & Morrison, 2009; Munemasa & Kitaoka, 2012; Ridet & Privat, 2000),

The chronic activation of the macroglia, a situation observed in glaucoma (Hernandez & Pena, 1997; Neufeld, 1999a; Ramírez *et al.*, 2010; Tezel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002), spurs a number of changes in the tissues (retina and optic nerve) that can result in dysfunction and death of the RGCs (Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009). These changes include (Fig. 5):

- Remodelling of the extracellular matrix, boosting the production of collagens IV and VI, and increasing the expression of MMPs (MMP-2, MMP-9) and their inhibitors at the level of the optic nerve head (Agapova *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2000). Furthermore, in parallel, this increase in MMPs can provoke alterations in the function of the barrier of the endothelial vascular cells by proteolytic degradation of the occludin proteins present in the tight junctions.
- In addition, in a parallel way, this surge in MMPs can alter the barrier function of the endothelial vascular cells by proteolytic degradation of occludin proteins present in these tight junctions (Grieshaber *et al.*, 2006; Grieshaber & Flammer, 2007).
- Secretion of inflammatory cytokines as tumoural necrosis factor- α (TNF- α), and IL-1 beta, which mediate the death of RGCs through several pathways: the activation of nuclear factor (NF)- κ B, nitric oxide synthesis and inflammatory assembly (Johnson *et al.*, 2011; Sappington & Calkins, 2008; Tezel *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2011; Yuan & Neufeld, 2000).
- Overproduction of NO. Under normal conditions, astrocytes communicate using NO as the neurotransmitter (Neufeld, 1999b). In stress situations, cytokines increase the expression of NOS-2 in astrocytes, stimulating a burst in NO production. This brings about the formation of toxic peroxy-nitrates for the axons, favouring the death of RGCs by apoptosis (Boehm *et al.*, 2011; Liu & Neufeld, 2000; Neufeld *et al.*, 1997b; Polazzi & Contestabile, 2002; Tezel & Wax, 2000b; Yan *et al.*, 2000).
- Loss of the capacity to regulate glutamate homeostasis for the reduced biosynthesis of glutamate transporters (GLAST), so that glutamate accumulates in the intercellular space, provoking neuronal death (Aronica *et al.*, 2003; Naskar *et al.*, 2000; Rieck, 2013; Vorwerk *et al.*, 1999).
- Capacity to act as antigen-presenting cells on expressing the class II major histocompatibility complex (MHCII) (molecule necessary for the presentation of the antigen to the T cells), thereby contributing to the immune response that could cause the destruction of the RGCs (Gallego *et al.*, 2012; Johnson & Morrison, 2009).
- Increase in size and number of processes, which favor the accumulation of glutamate, H⁺, and K⁺ in the intercellular space and that afterwards is introduced into the astrocyte cytoplasm, giving rise to cell oedema. This oedema prompts the disinsertion of the intermediate filaments and cell death (Ramírez *et al.*, 2001).

4.1.4 Secondary Alterations that Cause Ganglion-cell Death in Glaucoma

In glaucoma, most of the RGCs die by apoptosis, though necrosis can contribute in the final phases. The neurons respond directly to three main causes, such as: the loss of trophic support, the increase in excitatory amino acids (such as glutamate) and oxidative stress (Osborne, 2008; Wax & Tezel, 2002). The death of RGCs occurs in two phases. In the first and more rapid phase, the cells die from apoptosis. In the

second phase, which is slower, the neuronal loss is due to the toxic effects of the primary neurons degenerated in addition to the continual exposure to high IOP (Munemasa & Kitaoka, 2012).

Apoptosis of the RGCs results from the activation of the tumour-suppressor protein p53, which activates the caspase pathway. Caspases are central regulatory proteases of apoptosis (Wax *et al.*, 2008). These enzymes are present as inactive zymogens and once activated commence an organized cascade, which leads to the proteolysis of key cytosolic and nuclear components which trigger the destruction of the cell. Caspases can be activated by an extrinsic or intrinsic pathway. The extrinsic pathway involves the interaction of specific ligands, such as TNF- α , with pro-apoptotic receptors of the cell surface. However, the intrinsic pathway is regulated by pro-apoptotic molecules released by the mitochondria (Chowdhury *et al.*, 2008; Earnshaw *et al.* 1999; Pop & Salvesen, 2009).

It has been postulated that in RGCs, as in other neurons, “compartmentalized self-destruction” occur; suggesting that depending on the nature and location of the initial damage, the death of the soma can be preceded by a series of degenerative processes that affect the axons, the dendrites, and the neuronal synapses (Munemasa & Kitaoka, 2012). One of these self-destructive processes is the Wallerian degeneration, which occurs in severe cases of axonal damage (axonal crushing, axonal shearing), which extends synchronously through the axon in days (Coleman & Freeman, 2010; Tse, 2012). The second self-destructive process, called “dying back”, is prompted by general neuronal stress without an acute neuronal trauma. It begins with a disconnection of the synapses followed by an asynchronous progression of the destructive process towards the soma. In the case of the dying back, the neuron has an opportunity to return if the neuronal stress diminishes but, in Wallerian degeneration, the soma death by apoptosis is inevitable (Vidal-Sanz *et al.*, 2002; Whitmore *et al.*, 2005).

4.1.5 Neurotoxicity Mediated by Glutamate in RGCs

Glutamate is the most important excitatory neurotransmitter of the retina in vertebrates and its interactions with its specific membrane receptors are essential in retinal visual transduction. For physiological conditions to be maintained, excesses of glutamate must be eliminated from the extracellular environment. Glial cells, in particular astrocytes and Müller cells, gather this neurotransmitter through the GLAST transporter (Agarwal *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2005a). In glaucoma the mediated extracellular glutamate concentration augments, either due to its release by RGCs that die, or else due to a failure in the regathering mechanism, because of the lower expression of the GLAST transporter in the reactive astrocytes (Dreyer *et al.*, 1994; Lipton, 2001; Rieck, 2013). Consequently, the ionotropic glutamate receptors (mainly the NMDA type) become overstimulated, unleashing a massive entry of calcium into the neurons. This calcium overload contributes to the neurotoxicity and the death of ganglion cells by apoptosis (Dreyer, 1998; Sucher *et al.*, 1997).

4.1.6 Deprivation of Neurotrophins as the Death Mechanisms of the RGCs

RGCs project their axons towards specific cerebral regions where neurotrophins, which are vital for neuronal survival, are actively secreted. Neurotrophins are transported continuously, in a retrograde manner, from the superior colliculus to the soma of these cells. RGCs respond to a great variety of neurotrophins, but the main ones are: brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glia-derived neurotrophic factor (GDNF)(Johnson, *et al.*, 2011; Thanos & Emerich, 2005).

The interruption of axoplasm flow, with the subsequent deviation in the transport of neurotrophins (as occurs in glaucoma), can compromise the survival of RGCs, starting an apoptotic process (Nickells,

1996). However, in the retina, the glial cells (astrocytes and Müller glia) can synthesise diverse neurotrophins, notably BDNF. As mentioned above, the activation of glial cells in glaucoma could favour the secretion of neurotrophins, which may contribute to enhance the survival of the RGCs. Therefore, while the ocular hypertension may block a proper axoplasmic flow and therefore the arrival of neurotrophins, in a retrograde manner (Minckler *et al.*, 1976; Quigley *et al.*, 2000), the provision of neurotrophic factors by glial cells could in a certain way offset this initial deficit (Di Polo *et al.*, 1998; Peinado-Ramon *et al.*, 1996; Thanos & Emerich, 2005).

4.1.7 Neurotoxicity Mediated by the Free Radicals in the RGCs

In oxygen metabolism, oxygen reactive species are inevitably produced in association with the mitochondrial respiratory chain: superoxide anion, peroxide, and hydroxylic radicals. These are detoxified in the retina by very effective endogenous antioxidants, including several enzymes (Alarma-Estrany & Pintor, 2007; Erb & Heinke, 2011; Ghanem *et al.*, 2010; Lundmark *et al.*, 2006; Majsterek *et al.*, 2011; Pinazo-Duran *et al.*, 2013), such as superoxide dismutase (SOD), catalase or glutathione peroxidase (GPX), and other substances such as glutathione, ascorbic acid, β -carotene, melatonin and vitamin E.

During periods of hypoxia, metabolic stress, and other types of cell stress, the reactive oxygen species can accumulate to a critical point in which the cell functions are altered (Johnson & Morrison, 2009). These free radicals inflict severe damage, not only in the mitochondria but also in cell proteins, lipids, and nucleic acids, promoting cell death (Munemasa & Kitaoka, 2012). The excessive formation of free radicals is an etiopathological factor of many ocular diseases such as glaucoma (Agarwal *et al.*, 2009), in which vascular dysregulation or ischaemia can favour oxidative stress (Flammer, Haefliger, Orgul, & Resink, 1999). This can prompt a proliferation of proteins that cannot be repaired, an accelerated expression of MMP-9, and the overexpression of ET-1 (Dalle-Donne *et al.*, 2005).

In principle, free radicals could stimulate the endogenous neuroprotective mechanisms, but in more advanced phases, this effect is lost. Therefore, in glaucoma, the antioxidant capacity declines, and levels of glutathione, superoxide dismutase, catalase, and melatonin fall (Gherghel *et al.*, 2005; Gherghel, Mroczkowska, & Qin, 2013; Moreno *et al.*, 2004; Yildirim *et al.*, 2005).

4.1.8 Role of Nitrous Oxide (NO)

At adequate physiological concentrations, NO is crucial in the organism. NO is produced by a wide variety of cell types. In the neurons, it can function as a neurotransmitter and its release by endothelial cells stimulates the smooth-muscle vascular cells and causes vasodilation.

NO is synthesised by the action of the enzyme nitric oxide synthase (NOS). There are three forms of NOS: two called constitutive, the endothelial (NOS-1) and the neuronal (NOS-3) isoforms; and an inducible one (NOS-2), which is not expressed or only very weakly under physiological conditions, but when it is expressed it can provoke excess NO in the tissues (Bredt & Snyder, 1994; Knott & Bossy-Wetzel, 2009; Lowenstein, Dinerman, & Snyder, 1994; Yun, *et al.*, 1997; Zhang & Snyder, 1995). In normal eyes, NOS-1 is sparsely present in astrocytes throughout the optic nerve head. In glaucomatous optic nerve heads, almost every astrocyte is positive for NOS-1. NOS-1 immunoreactivity is abundantly present throughout the prelaminar region and the lamina cribrosa and is localized inside the diminished nerve fiber bundles (Neufeld, *et al.*, 1997a). In glaucoma, an increase has been reported in the expression of NOS-2 by reactive astrocytes (Liu & Neufeld, 2000; Neufeld *et al.*, 1997b), being present in a few cells in the disorganized lamina cribrosa of the glaucomatous eye and is not present at all in normal tis-

sue. NOS-3 is present in normal eyes in the vascular endothelia of small blood vessels of the prelaminar region. In glaucomatous tissue, NOS-3 is present in astrocytes and in the vascular endothelia of large and small vessels (Neufeld *et al.*, 1997a). NO in high concentrations can be neurotoxic. Furthermore, it can reach the axons of the ganglion cells, where there are high concentrations of superoxide anion (free radical generated by damage from ischaemia-reperfusion), and can form peroxynitrates. The superoxide anion and the peroxynitrates are trapped in the axons and are spread by the axon towards the retina and the lateral geniculate body, inducing apoptosis in the neurons (Flammer & Mozaffarieh, 2007; Neufeld, 1999b).

4.2 Inflammation as a Physiopathological Mechanism

The pathogenic mechanisms of glaucoma include the inflammatory mechanisms triggered by the immune response. In human and experimental glaucoma, a chronic activation of the microglia in the retina and in the optic nerve has been reported, as well as an alteration of the T cells, increased autoantibody production, immunoglobulin deposits in the retina, and activation of the complement (Rieck, 2013; Tezel *et al.*, 2007).

Although the immune response in glaucomatous patients may initially be beneficial to repair tissue, the failure of immunoregulatory mechanisms related to chronic stress of this pathology could have neurodegenerative consequences. Microglia would be involved in this immune response (Bosco *et al.*, 2011; Tezel, 2013). In the CNS, the main function of the microglia is the continuous surveillance over the nerve parenchyma. In this way, it takes care of cleaning tissue and limiting the neurodegenerative consequences of stress (Boya *et al.*, 1979).

The activation of the microglia is a sign that an inflammatory process is under way in the CNS (Block *et al.*, 2007). The activated microglia act as a phagocyte, eliminating the apoptotic neurons (the RGCs in the case of glaucoma), cell remains, and pathogens. These latter are recognized by the microglia through the toll-like receptors (TLR), the activation of which causes the secretion of proinflammatory cytokines (e.g. TNF- α), NO and prostaglandins that induce the neurodegenerative process (Gonzalez-Scarano & Baltuch, 1999).

In the human glaucomatous optic-nerve heads, microglia can reportedly express several MMPs and their inhibitors, suggesting that they could participate in the remodelling of the extracellular matrix, which is key in the physiopathology of glaucoma (Yuan & Neufeld, 2001; Yuan & Neufeld, 2000). Furthermore, these cells, as discussed above, can secrete TNF- α , reactive oxygen species and NO, which have been found to be involved as mediators of neuronal damage in glaucoma (Yuan & Neufeld, 2001). Moreover, increased expression of TLRs 2, 3, and 4, heat-shock proteins (HSP) HSP27, HSP60, and HSP72, as well as adapter proteins and kinases characteristic of the TLR signalling cascade has been found in human glaucoma (Tezel *et al.*, 1998; Tezel *et al.*, 2000; Tezel & Wax, 2000b; Yang *et al.*, 2011). In this way, the TLRs and the increase in the HSPs could contribute to the activation of the innate immune system in this pathology (Tezel *et al.*, 2010).

It has been postulated that the onset of glaucoma could also be mediated by an autoimmune mechanism. In human glaucoma, as mentioned above, the amount of HSPs is high (Tezel *et al.*, 1998; 2000; Tezel & Wax, 2000b). These proteins are components of cell-defence mechanisms and are overexpressed under pathological conditions. Some have a neuroprotective effect (HSP27 and HSP70) and can be induced by ischaemia in retinal glia. However, others can induce apoptosis (HSP60) (Tezel *et al.*, 2004).

In glaucoma patients, high concentrations of antibodies against neuron γ -enolase, rhodopsin and α -crystallin, and HSPs, among others, have been found (Maruyama *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 1995; Tezel *et al.*, 2000). The presence of antibodies against HSPs could be explained because these proteins are phylogenetically highly conserved proteins and therefore present molecular similarities between the host and the pathogens, causing at times crossed reactions (Rieck, 2013). Other theories seek to explain the presence of antigens and specific autoantibodies of the CNS in peripheral blood. The oxidised proteins, by reactive oxygen species, or fragmented by metalloproteinases, could serve as autoantigens (e.g. HSP27, HSP70, or HSP90) (Cauwe *et al.*, 2009).

Autoantibodies can bind to antigens on the surface of the cells or capture circulating antigens, forming immunocomplexes that can accumulate in the lymph nodes or in different organs. The immunocomplexes have the potential of activating the cascade of the complement by the classical pathway (Ren & Danias, 2010; Ricklin *et al.*, 2010). Autoantibodies can be destructive but also protective, inasmuch as they can help eliminate cell damage and promote cell repair (Bell *et al.*, 2013). In this line, they can mask the self-recognition against the pathogenic autoantibodies, neutralize inflammatory cytokines such as TNF α , through antibodies against cytokines, and have an immuno-modulating function (Wax & Tezel, 2009). The decrease in reactivity of these protective autoantibodies could provoke a loss of immune defence, increasing the risk of developing experimental (Grus & Sun, 2008; Wax *et al.*, 2008) and human (Grus & Sun, 2008; Wax *et al.*, 2008) glaucoma.

The participation of the cell immune response against neuronal components has been confirmed by the presence of T cells and macrophages in the brain of patients with neurodegenerative diseases (Rieck, 2013). The inflammatory process in the CNS can occur when the T cells and the autoantibodies gain access to the CNS through the blood, by the alteration of the BBB (Grieshaber & Flammer, 2007). These T lymphocytes are again reactivated by antigen-presenting cells (e.g. microglia), provoking the release of inflammatory cytokines and therefore the maintenance of the immune response (Rieck, 2013).

Antibodies bind to the neuronal antigens, altering their function, causing cell stress, and finally apoptosis of the neuron. The microglia go to the site of the inflammation, eliminating the cell remains by endocytosis and presenting their antigens on the surface, activating the adaptive immune response. In fact, in unilateral laser-induced glaucoma, the overexpression of MHC-II by the microglia has been demonstrated (Gallego *et al.*, 2012). The adaptive immunity activates the T CD4⁺ cells, specific of the antigen, and the differentiation of the B cells in plasma cells that produce antibodies, in the peripheral tissues. The antibodies cross the BBB mainly under pathological conditions (e.g. elevated IOP) (Nguyen *et al.*, 2002; Rieck, 2013). These immunoglobulins can bind to the cell surface or else enter the cell by a receptor or by endocytosis (e.g. anti-HSP27). Once in the cytoplasm of the neurons, the immunoglobulins cause apoptosis (Tezel & Wax, 2000b). The recurrent release of cytokines and presentation of antigen starts the vicious circle in the inflammatory mechanism.

In conclusion, in glaucoma the chronic stress that results in the retina and the optic nerve, through the overexpression of heat-shock proteins and ROS generation, are determinant in the immune response. The alterations in the interactions between the glia cells and the neurons under stress conditions, together with an increase in the antigenicity of the damaged tissue, as well as the increase in the presenting activity of the antigen in the resident glial cells have a determining role in the behaviour of the immune system in glaucoma.

5 Animal Models of Glaucoma

A variety of natural-occurring glaucoma models have been described in different animal species. Albino New Zealand rabbits exhibit spontaneous alterations in trabecular mesh development that could be the cause of elevated IOP (Kolker, *et al.*, 1963). Other dog models of closed-angle glaucoma in beagles, cocker spaniels, and basset hounds have been reported. Cocker spaniels develop glaucoma at an early age, whereas beagles and basset hounds begin to develop the disease between 6 and 12 months of age. Beagles expressing autosomal recessive phenotype present a pre-glaucoma stage characterized by increased IOP and an open angle (Gelatt, *et al.*, 1977).

Models of induced glaucoma were developed for non-human primates by inducing elevated IOP via intraocular injections of the proteolytic enzyme alpha chymotrypsin (Kalvin *et al.*, 1966). Alpha chymotrypsin, however, produced highly variable IOP responses depending on the doses (Fernández-Durango *et al.*, 1991). Developed laser induced scar formation of the trabecular meshwork (TM) with an Argon laser (Gaasterland & Kupfer, 1974). Recently, the use of laser to induce experimental glaucoma in non-human primates was implemented with a high-power diode laser (Wang *et al.*, 1998). The injection of latex microspheres into the anterior chamber of the rhesus monkey eye introduced a new, inexpensive technique (Weber & Zelenak, 2001).

The pig model is more accessible than non-human primates. The retina is more similar to the human retina than that of other larger mammals. This constitutes a model for eye diseases and has been extensively studied. The IOP in the pig and minipig was increased by episcleral vein cauterization (Shareef *et al.*, 1995) or by the injection of latex fluorospheres into the anterior chamber (Ruiz-Ederra *et al.*, 2005).

Experimental rodent models have been used to study glaucomatous neuropathy because they are inexpensive and easier to handle than other animal models (dog and rabbit). The most relevant rodent models of experimental glaucomatous optic neuropathy are those that obstruct aqueous humour outflow. In rats, this can be accomplished by retrograde injections of hypertonic saline into the aqueous humour outflow pathways via episcleral veins (Morrison *et al.*, 1997) or using external laser to the anterior chamber angle (Levkovitch-Verbin *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 1998; WoldeMussie *et al.*, 2001). In addition, intracameral injections of foreign substances, including hyaluronic acid (Moreno *et al.*, 2005b) and latex microspheres were used as methods of elevating IOP and obstructing aqueous outflow (Sappington *et al.*, 2010). In mice, hypertonic saline injection, external laser and injection of microspheres induce higher IOP (Aihara *et al.*, 2003; Sappington *et al.*, 2010; Walsh *et al.*, 2009). Another model, using cautery of one or more large external episcleral veins immediately intensifies pressure, which gradually returns to normal after one or more months (Grozdanic *et al.*, 2003; Mittag *et al.*, 2000; Neufeld *et al.*, 1999; Sawada *et al.*, 1999; Shareef *et al.*, 1995).

The DBA/2J mouse line, is the most well-characterized of the spontaneous rodent glaucoma models (John, 2005; John *et al.*, 1998; Libby *et al.*, 2005). In this model, mutations of 2 genes results in iris stroma atrophy and pigment dispersion in the anterior segment and the trabecular meshwork, which results in reduced aqueous humour outflow. In most animals, IOP increases at about 7-8 months of age, although its extent varies among animals of the same age, and between the two eyes of a single animal (Schlamp *et al.*, 2006). More recently, other transgenic mouse models have been developed, including one with a targeted mutation in the gene for the alpha-1 subunit of collagen type 1, which demonstrates a gradual rise in IOP and progressive optic-nerve axon loss (Mabuchi *et al.*, 2004). The transgenic mouse expressing a mutant form of human myocilin protein has also been described (Senatorov *et al.*, 2006;

Zhou *et al.*, 2008). Finally, mutations affecting a serine protease (PRSS56) cause a mouse phenotype resembling closed-angle glaucoma (Nair *et al.*, 2011).

It has been suggested that *Foxc1*^{+/-} and *Foxc2*^{+/-} mice may lead to the identification of genes that interact with *Foxc1* and *Foxc2* to produce a phenotype with elevated IOP and glaucoma (Smith *et al.*, 2000). Expression of ODAG (ocular development-associated gene) under the control of the mouse *Crx* promoter significantly raised the IOP (approximately 50% above control) (Sasaki *et al.*, 2009).

6 Glial and Retinal Ganglion Cells in Experimental Unilateral Laser-induced Ocular Hypertension

Altered crosstalk between RGCs and microglia, astrocytes or, oligodendrocytes has been proposed as an early factor in the pathophysiology of glaucoma (Bosco *et al.*, 2011). The lack of agreement concerning the role played by the glia in ganglion cells has raised the need for research on both the location and the discrimination of responses which take place simultaneously in the RGCs and glia (Johnson & Morrison, 2009).

It has been suggested that reactive glial cells could help protect retinal ganglion cells, as they can be a source of neurotrophic factors (Di Polo *et al.*, 1998). On the contrary, reactive glial cells can exacerbate neuronal damage and may become one of the aetiologies of experimental glaucoma through the release of cytokines, reactive oxygen species, and functional disorders of the glutamate uptake in Müller cells (Kawasaki *et al.*, 2000). This could negatively influence ganglion cells, which could lose their normal functional support (Johnson *et al.*, 2007). In this regard, the colocalization of caspase 3 and GFAP in astrocytes and Müller glia in experimental glaucomatous retinas has indicated that these cells may be involved in the apoptosis process, in which the increase of nitric oxide (NO) and tumour-necrosis factor (TNF- α) produced by glial cells would lead to the death of retinal ganglion cells exposed to stressful conditions (Tezel & Wax, 2000a; Wang & Tay, 2005).

In a recent study in a mouse model of ocular hypertension (OHT), both the eye with laser-induced OHT and the contralateral eye (Gallego *et al.*, 2012) were analysed for the purpose of identifying concurrent responses of macroglial and retinal ganglion cells and whether there was an inflammatory reaction to OHT and then comparing them with retinas from naïve eyes. These findings correspond to changes observed after 15 days of lasering the treated eye. Although the experimental conditions of this study do not completely mimic or serve as a model for human glaucomatous optic neuropathy, they can be used to investigate OHT-induced changes undergone by retinal macroglia, microglia, and ganglion cells. In this model of laser-induced OHT, a substantial rise in the IOP was evident 24 h after lasering, this continuing for 4 days and then gradually returning to the basal value after the fifth day, so that by one week after lasering, the IOP values in the treated animals were comparable for both eyes (Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

Numerous in vitro and in vivo studies have shown GFAP to be essential for several astrocyte functions such as proliferation, differentiation, extension of processes, vesicle trafficking, astrocyte-neuron interaction (Middeldorp & Hol, 2011), astrogliosis (Perez-Alvarez *et al.*, 2008), and protection against cerebral ischaemia (Middeldorp & Hol, 2011). The intermediate filament protein GFAP of astrocytes is considered to be an early marker for retinal injury and is commonly used as an index of gliosis-hypertrophy (Hernandez, 2000; Ramírez *et al.*, 2001; Varela & Hernandez, 1997). Two relevant morpho-

logical alterations in gliotic Müller cells are hypertrophy and the expression of the filament protein GFAP (Reichenbach & Bringmann, 2010).

In the above-mentioned model of laser-induced OHT (Gallego *et al.*, 2012), it has been reported that OHT induces a differential GFAP-expression pattern in the macroglial cells of the retina, reduces GFAP-IR in astrocytes, and increases GFAP-IR in Müller cells (Fig. 7). Such opposite reactions in astrocytes and Müller cells in terms of GFAP-IR has been reported in OHT eyes of two models of laser induced glaucoma in rats (Kanamori *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2010) and in models of experimental diabetes in rats (Barber *et al.*, 2000).

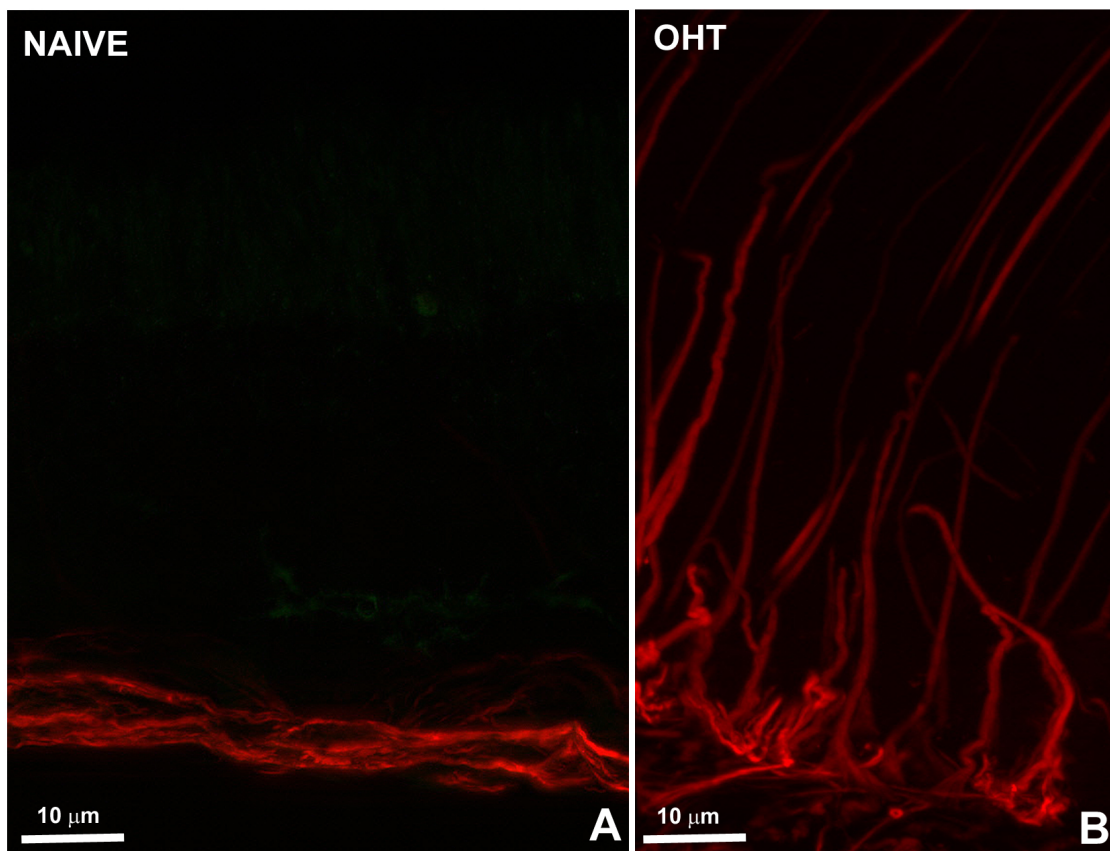


Figure 7: Macroglial cells of the mice retina. Immunostaining for GFAP (red). The pressure exerted by the cover glass on the retinal whole-mount, produced a retinal-like section effect in some retinal borders. A. GFAP+ astrocytes in the nerve-fibre-RCG layer in a normal mice retina (naive). B. After 15 days of laser-induced OHT, GFAP expression in Müller cells is upregulated. Müller cells exhibit a radial morphology that creates a columnar matrix that maintains the laminar structure of the retina [GFAP: glial fibrillary acidic protein; OHT: ocular hypertension]. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome

In addition, the laser-induced OHT-model in mouse has revealed astrocyte changes, consisting of fewer secondary processes, decreased GFAP-labelled retinal area (Fig. 8C1,C2) (Gallego *et al.*, 2012), changes also demonstrated in laser-induced experimental glaucoma in rats that could impair the neuro-

supportive role of astrocytes (Lorber *et al.*, 2012) and could participate in the death of RGCs (Salinas-Navarro *et al.*, 2009). In experimental glaucoma models this reactive, non-proliferative gliotic response (Gallego *et al.*, 2012; Bolz *et al.*, 2008; Inman & Horner, 2007; Ramírez *et al.*, 2010) is the consequence of slow degeneration, while rapid degeneration leads to a proliferative gliosis (Bolz *et al.*, 2008; Inman & Horner, 2007; Soto *et al.*, 2008).

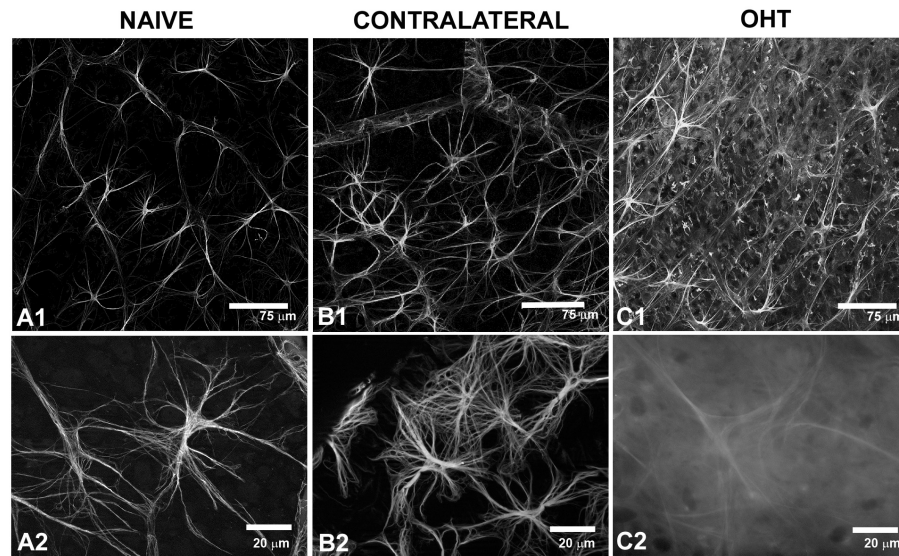


Figure 8: GFAP immunostaining of equivalent areas of the mice retinal whole-mounts. Astrocyte morphology and GFAP-IR of macroglial cells in naïve and in contralateral and OHT-eyes after 15 days of laser-induced OHT. A. In naïve eyes the astrocytes form a homogeneous plexus on the nerve-fiber-RGC layer of GFAP+ cells regularly distributed throughout the retina (A1). The astrocytes have a rounded body from which numerous primary and secondary processes extended (A2). B. In contralateral eyes astrocytes form a honeycomb network (B1) and are more robust (B2) than in naïve eyes. C. Astrocyte morphology in OHT-eyes is not uniform (C1), with astrocytes in which primary and secondary processes could be observed and astrocytes in which only primary processes could be observed (C2). [GFAP: glial fibrillary acidic protein; OHT: ocular hypertension; RGC: retinal ganglion cells]. Confocal microscopy (A1, B1, C1). Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome (A2, B2, C2).

NF-200 is a component of the neuronal cytoskeleton. Under normal conditions, anti-NF-200 labels RGC axons but rarely RGC somas (Bizzi *et al.*, 1991). It is known that an elevated IOP has been associated with the disruption of the axonal transport (Mabuchi *et al.*, 2004) in different animal models (Anderson *et al.*, 1974; Minckler *et al.*, 1976; Pease *et al.*, 2000; Quigley & Anderson, 1977; Quigley, *et al.*, 1981). A factor deeply involved in axonal transport is phosphorylation of the heavy neurofilament subunit (NF-H) (Lee & Cleveland, 1996; Nixon & Sihag, 1991; Pant & Veeranna, 1995). In a monkey model of laser-induced chronic ocular hypertension (Kashiwagi *et al.*, 2003), most NF-Hs in RGC axons in the glaucomatous eyes were significantly dephosphorylated by high IOP, which may be a sign of damaged axonal transport. In a mouse model of laser-induced ocular hypertension (OHT) (Gallego *et al.*, 2012), it

has been reported that the number of NF-200+RGCs significantly augmented in OHT-eyes in comparison to naïve and contralateral eyes. These RGCs that had accumulated NF-200 in their cell bodies, proximal axon, and primary dendrites (Fig. 9) most probably represented functionally impaired RGCs as a consequence of the disruption of the axonal transport (Gallego *et al.*, 2012; Salinas-Navarro *et al.*, 2009).

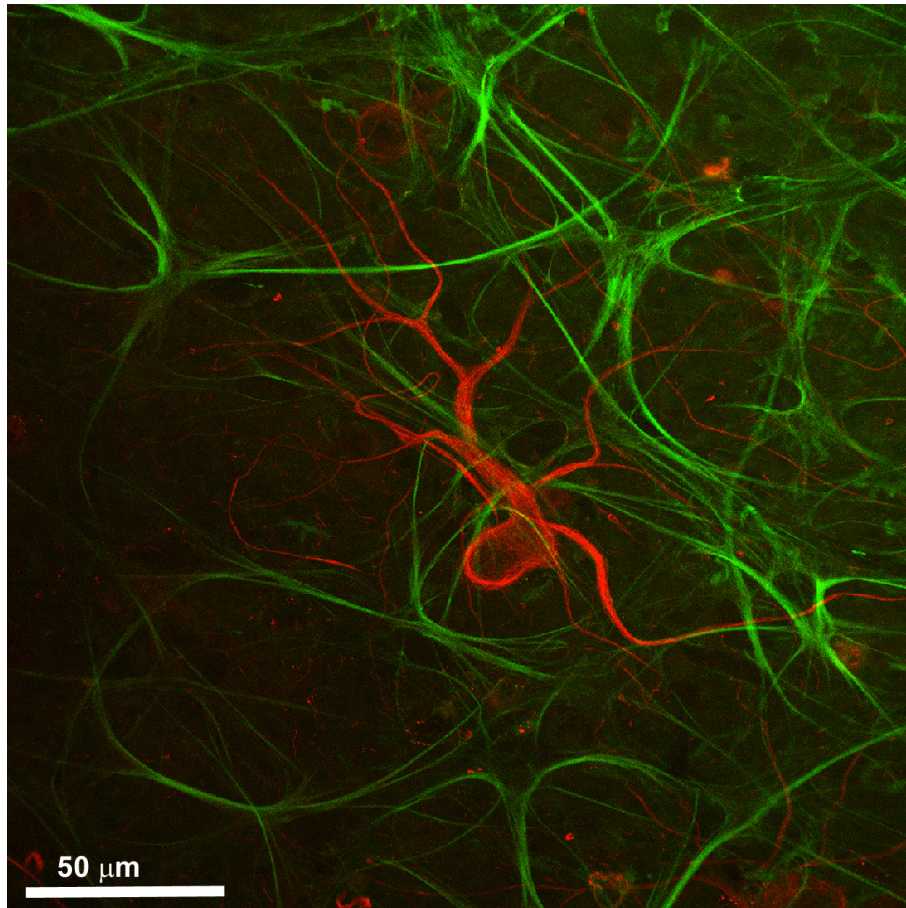


Figure 9: Retinal whole-mount. Double immunostaining for NF-200 and GFAP after 15 days of laser-induced OHT. RGCs (red). Astrocyte (green). Abnormal staining of cell bodies and primary dendrites of RGCs in OHT-eyes. [GFAP: glial fibrillary acidic protein; NF-200: neurofilament of 200kD; OHT: ocular hypertension; RGCs: retinal ganglion cells]. Confocal microscopy.

Notably, in this mouse model of laser-induced ocular hypertension (OHT), the NF-200+RGC somas of the OHT eyes tended to be more abundant in areas of the retina having less GFAP-labelled retinal area (Gallego *et al.*, 2012). As demonstrated in rodent an impairment of axonal support exerted by astrocytes could possibly increase the vulnerability of the axon to IOP-induced stress (Morrison *et al.*, 2011; Dibas *et al.*, 2008) offered a possible explanation, according to which rat retinas with OHT showed a downregulation of AQP4 protein and an accumulation of ubiquitin in astrocytes which might not be appropriately transferred to adjacent RGCs. The attenuation of ubiquitination in axons may result in the

accumulation of several proapoptotic proteins (i.e. caspases, Bax and Bad) (Dahlmann, 2007) and thus contributes to axonal degeneration in glaucoma. It is known that a severe axon insult can result in a rapid Wallerian degeneration of the distal axon (Conforti *et al.*, 2007). On the contrary, milder insults may result in degeneration via the slower process of axonal dying back and greater functional connectivity between the soma, proximal axon, and the distal axon segments (Buckingham *et al.*, 2008; Crish *et al.*, 2010; Fu & Sretavan, 2010; Howell *et al.*, 2007; Schlamp *et al.*, 2006; Whitmore *et al.*, 2005). This situation involving the NF-200+RGCs in OHT-eyes (Fig. 9) could represent RGCs that, after having suffered an insult, retain their fundamental homeostatic mechanisms (Gallego *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2011), which might provide an opportunity for therapeutic rescue in the human disease.

A striking feature in mice retina contralateral to experimental glaucoma was that macroglia exhibited morphological signs of reactivity that differed from naïve (Fig. 8A) and OHT-eyes (Fig. 8B): astrocytes were more robust, formed a honeycomb-like network, and had an increase in GFAP-labelled retinal area (Gallego *et al.*, 2012) (Fig. 8B). By contrast, the contralateral retinas of two laser-induced models of glaucoma in rats exhibited a decrease in both the retinal area occupied by astrocytes (Ramírez *et al.*, 2010) and the GFAP-IR in astrocytes (Kanamori *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2010). The different behaviour of the retinal macroglia of the contralateral eyes between mice and rats could be a species-related phenomenon or could depend on the experimental model, such as differences in time to build pressure or time to return to normal values, among other possibilities (Morrison *et al.*, 2011).

It has been reported that the glial-activation response in experimental and human glaucomatous eyes involves the activation of a glial immunoregulatory function and antigen-presenting ability (Steele *et al.*, 2006; Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009). The expression of MHC-II in glial cells, required for antigen presentation to T cells, is upregulated in the glaucomatous human retina and optic-nerve head (Tezel *et al.*, 2003; Tezel & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009; Yang *et al.*, 2001). In addition, microglial activation has been demonstrated in human eyes with glaucoma (Neufeld, 1999a), in experimental models of OHT (Gallego *et al.*, 2012; Johnson & Morrison, 2009; Naskar *et al.*, 2002; Tezel *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2000) (Fig. 10) and in a genetic mouse model of glaucoma (Inman & Horner, 2007). Also, MHC-II immunoreaction in Müller cells supports the idea of immune activation in the eyes with laser-induced OHT (Gallego *et al.*, 2012) (Fig. 11).

A lack of relation between immune responses in DBA/2J mice retina and greater IOP has been reported (Fan *et al.*, 2010) and recently corroborated by Bosco *et al.* (2011), who saw no strict correlation between higher IOP and early microglia activation. These researchers concluded that a rise in IOP may not be a contributing factor in these initial changes (Bosco *et al.*, 2011). It bears mentioning that most microglial cells of the retinas contralateral to laser-induced experimental glaucoma (normal IOP values) showed morphological changes and MHC-II upregulation in comparison with naïve eyes (Gallego *et al.*, 2012). This MHC-II upregulation was detected in the three retinal glial types (astrocyte, Müller cells, microglia) (Fig. 10, 11) (Gallego *et al.*, 2012), which were not temporally related to surgical eyeball manipulations, leading to the postulation that an immunologically mediated process was taking place in retinas contralateral to experimental glaucoma. This glial response may contribute to the maintenance of tissue homeostasis, perhaps in an effort to protect optic axons from a compromised BBB (Bosco *et al.*, 2011; Neufeld, 1999a). A more sustained insult or prolonged neuronal stress may lead to glial changes that could potentially contribute to neuronal decline.

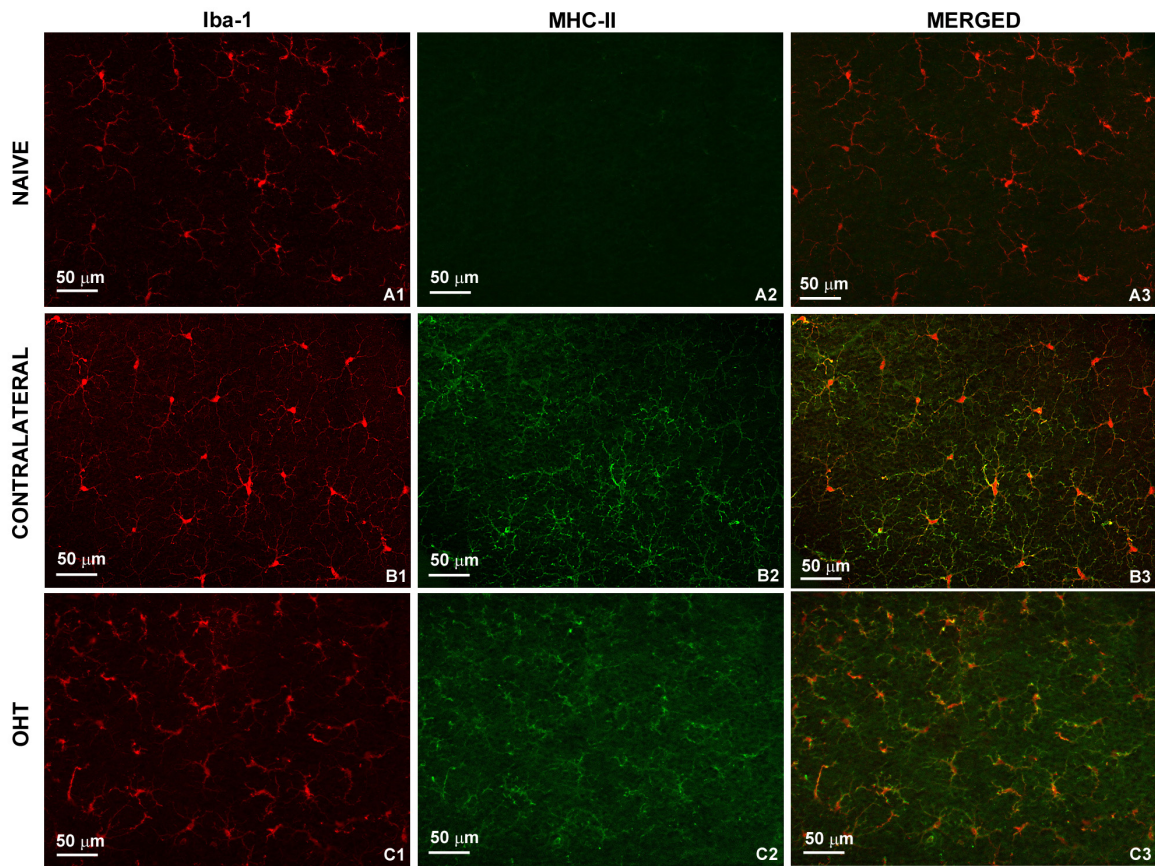


Figure 10: MHC-II expression of Iba-1+ cells in retinal whole-mounts after 15 days of laser-induced OHT. Double immunofluorescence staining for Iba-1 (red) and MHC-II (green). A. in naïve retinas, a constitutive weak expression of MHC-II is observed in some Iba-1+ cells throughout the retina. B. in contralateral eyes, Iba-1+ microglial cells of the retina have morphological signs of activation and show a stronger expression of MHC-II immunoreactivity throughout the retina in comparison with naïve. C. Iba-1+ cell in OHT-eyes have a similar up-regulation of MHC-II as did contralateral. In comparison with contralateral retinas, the cell bodies are larger and the processes thicker and more retracted. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome. [Iba-1: ionized calcium-binding adapter molecule 1; MHC-II: major histocompatibility complex class II molecule; OHT: ocular hypertension].

In a model of laser-induced OHT RGC loss was documented using a retrograde tracer applied to both superior colliculi one week prior to animal processing. In that study, the contralateral retinas showed the typical distribution of RGCs throughout the retina (Salinas-Navarro *et al.*, 2009). Based on this data, macroglial activation as well as MHC-II expression on astrocytes and Müller cells of contralateral retinas to experimental glaucoma could have exerted a neuroprotective effect (Fig. 11) (Gallego *et al.*, 2012). It has been suggested that the expression of modest levels of MHC-II may inhibit the activation of invading T cell, whereas overexpression of these molecules may promote the activation of autoimmune T cells, thereby augmenting the inflammatory cascade, leading to tissue damage (Shao *et al.*, 2007; Tezel & the

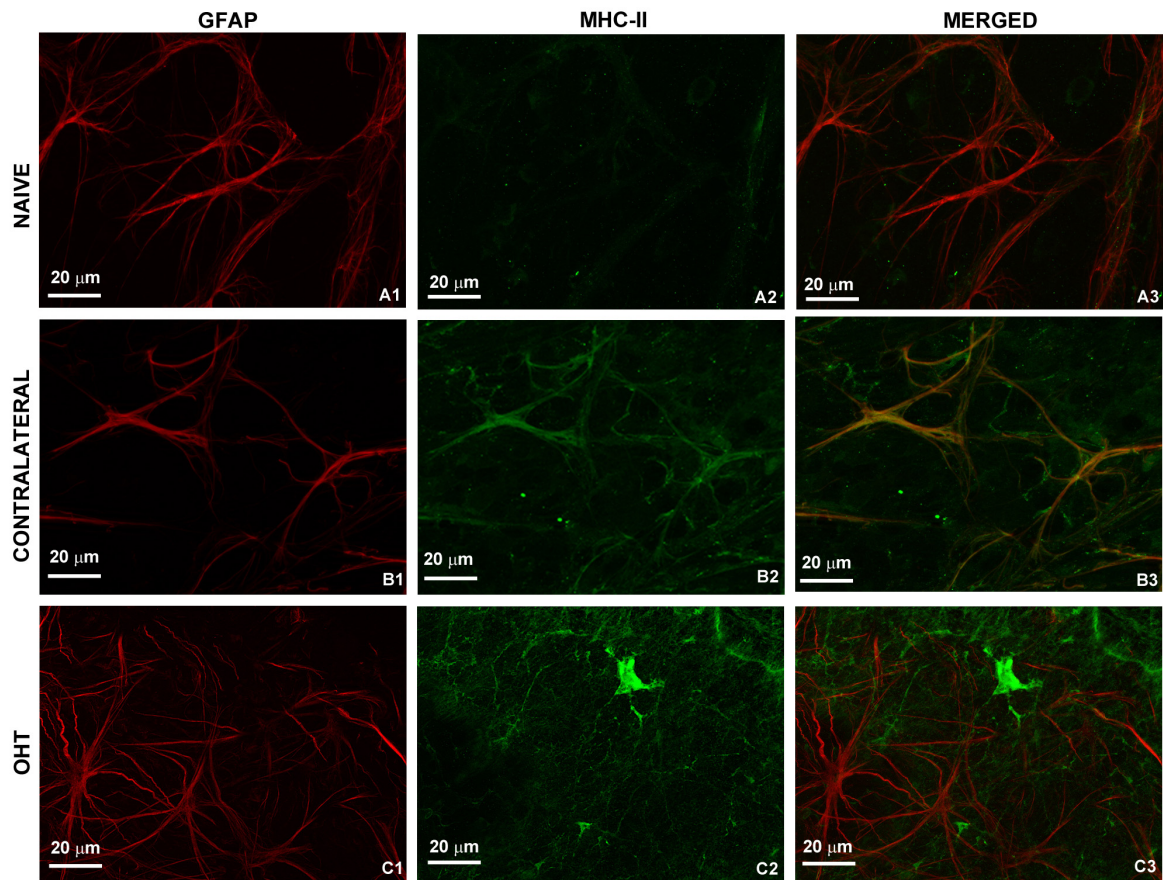


Figure 11: MHC-II expression of GFAP+ cells in retinal whole-mounts after 15 days of laser-induced OHT. Double immunostaining for GFAP (red) and MHC-II (in green). A. A weak constitutive MHC-II expression is found rarely in the naïve retina. B. In contralateral eyes, MHC-II immunoreactivity of astrocytes and Müller cells is increased with respect to naïve eyes. C. In OHT-eyes, MHC-II immunoreactivity of Müller cells is notably upregulated in comparison with contralateral eyes. Fluorescence microscopy and image acquisition using the ApoTome. [GFAP: glial fibrillary acidic protein; MHC-II: major histocompatibility complex class II molecule; OHT: ocular hypertension].

Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group, 2009) The gliotic behaviour in eyes contralateral to experimental glaucoma could be related to the immune response. The absence of NF-200+RGCs (sign of RGC degeneration) leads to the postulation that the MHC-II up-regulation in contralateral eyes could bolster neuroprotection (Gallego *et al.*, 2012).

7 Conclusions

Glaucoma, the second leading cause of blindness in the world, is a multifactorial neurodegenerative disease characterized by an irreversible decrease of retinal-ganglion cells of the retina (RGCs) and their ax-

ons. Many of the proposed mechanisms in the development and progression of this pathology are linked to increased intraocular pressure (IOP). Although IOP was considered a major factor responsible for the glaucomatous neuropathy, today the role has been relieved for multiple factors: aging, vascular dysregulation, and the involvement of the immune system. Glial cells from the retina and the optic nerve in the glaucomatous optic neuropathy show a chronic activation. The increased antigen-presenting activity in macro- and microglial cells may be key in the role of the immune system in glaucoma. Persistent changes in GFAP and MHC-II expression took place in macro- and microglial cells, both in the contralateral and OHT eyes of adult Swiss mice. These changes could be related to immune-system activation in the glaucomatous neuropathy. Knowledge of the role of the immune system in the glaucoma physiopathology could lead to the development of more effective neuroprotective treatments for modulating the immune response in order to achieve, on the one hand, tissue repair and neuronal survival and, on the other, decreased immune-mediated neurodegenerative damage.

References

- Abbott, N. J., Rönnebeck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 41-53.
- Agapova, O. A., Ricard, C. S., Salvador-Silva, M., & Hernandez, M. R. (2001). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human optic nerve head astrocytes. *Glia*, 33, 205-216.
- Agarwal, R., Gupta, S., Agarwal, P., Saxena, R., & Agrawal, S. (2009). Current concepts in the pathophysiology of glaucoma. *Indian Journal of Ophthalmology*, 57, 257-266.
- Aiello, L. P., Northrup, J. M., Keyt, B. A., Takagi, H., & Iwamoto, M. A. (1995). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Archives of Ophthalmology*, 113, 1538.
- Aihara, M., Lindsey, J. D., & Weinreb, R. N. (2003). Experimental mouse ocular hypertension: Establishment of the model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 4314-4320.
- Alarma-Estrany, P., & Pintor, J. (2007). Melatonin receptors in the eye: Location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacology & Therapeutics*, 113, 507-522.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, 36, 165-179.
- Ames III, A. (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Research Reviews*, 34, 42-68.
- Anderson, D. R., & Hendrickson, A. (1974). Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 13, 771-783.
- Aronica, E., Gorter, J. A., Ijlst-Keizers, H., Rozemuller, A. J., Yankaya, B., Leenstra, S., & Troost, D. (2003). Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: Opposite regulation of glutamate transporter proteins. *European Journal of Neuroscience*, 17, 2106-2118.
- Barber, A. J., Antonetti, D. A., & Gardner, T. W. (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. the penn state retina research group. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3561-3568.
- Behzadian, M. A., Wang, X., Windsor, L. J., Ghaly, N., & Caldwell, R. B. (2001). TGF- β increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: Possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 853-859.
- Bell, K., Gramlich, O. W., Von Thun Und Hohenstein-Blaul, N., Beck, S., Funke, S., Wilding, C., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2013). Does autoimmunity play a part in the pathogenesis of glaucoma? *Progress in Retinal and Eye Research*,

36, 199-216.

- Benhar, I., London, A., & Schwartz, M. (2012). The privileged immunity of immune privileged organs: The case of the eye. *Frontiers in Immunology*, 3, 296.
- Bill, A. (1975). Blood circulation and fluid dynamics in the eye. *Physiological Reviews*, 55, 383-417.
- Bill, A., Sperber, G., & Ujii, K. (1983). Physiology of the choroidal vascular bed. *International Ophthalmology*, 6, 101-107.
- Bill, A., Tornquist, P., & Alm, A. (1980). Permeability of the intraocular blood vessels. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom*, 100, 332-336.
- Bizzi, A., Schaetzle, B., Patton, A., Gambetti, P., & Autilio-Gambetti, L. (1991). Axonal transport of two major components of the ubiquitin system: Free ubiquitin and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase PGP 9.5. *Brain Research*, 548, 292-299.
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nature Review Neuroscience*, 8, 57-69.
- Boehm, M. R., Oellers, P., & Thanos, S. (2011). Inflammation and immunology of the vitreoretinal compartment. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10, 283-309.
- Bolz, S., Schuettauf, F., Fries, J. E., Thaler, S., Reichenbach, A., & Pannicke, T. (2008). K(+) currents fail to change in reactive retinal glial cells in a mouse model of glaucoma. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246, 1249-1254.
- Bosco, A., Steele, M. R., & Vetter, M. L. (2011). Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *Journal of Comparative Neurology*, 519(4), 599-620.
- Boya, J., Calvo, J., & Prado, A. (1979). The origin of microglial cells. *Journal of Anatomy*, 129, 177-186.
- Bredt, D. S., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 175-195.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N.N., Reichenbach, A. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25, 397-424.
- Bron, A. J., Tripathi, R. C., & Tripathi, B. J. (1997). The choroid and uveal vessels. In A. J. Bron, R. C. Tripathi & B. J. Tripathi (Eds.), *Wolff's anatomy of the eye and orbit* (eighth edition). (pp. 371-410). London.: Chapman & Hall Medical.
- Buckingham, B. P., Inman, D. M., Lambert, W., Oglesby, E., Calkins, D. J., Steele, M. R., Vetter, M.L., Marsh-Armstrong, N., & Horner, P. J. (2008). Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma. *Journal of Neuroscience*, 28, 2735-2744.
- Burgoyne, C. F. (2011). A biomechanical paradigm for axonal insult within the optic nerve head in aging and glaucoma. *Experimental Eye Research*, 93, 120-132.
- Caprioli, J., & Spaeth, G. L. (1985). Comparison of the optic nerve head in high- and low-tension glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 103, 1145-1149.
- Cauwe, B., Martens, E., Proost, P., & Opdenakker, G. (2009). Multidimensional degradomics identifies systemic autoantigens and intracellular matrix proteins as novel gelatinase B/MMP-9 substrates. *Integrative Biology*, 1, 404-426.
- Cellini, M., Strobbe, E., Gizzi, C., Balducci, N., Toschi, P. G., & Campos, E. C. (2012). Endothelin-1 plasma levels and vascular endothelial dysfunction in primary open angle glaucoma. *Life Sciences*, 91, 699-702.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., & Bhat, G. K. (2008). Caspases - an update. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 151, 10-27.
- Coffman, R. L., Seymour, B. W., Leberman, D. A., Hiraki, D. D., Christiansen, J. A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F., Finkelman, F.D., & Bond, M. W. (1988). The role of helper T cell products in mouse B cell differ-

entiation and isotype regulation. *Immunological Reviews*, 102, 5-28.

- Cogan, D. G., & Kuwabara, T. (1967). The mural cell in perspective. *Archives of Ophthalmology*, 78, 133-139.
- Coleman, M. P., & Freeman, M. R. (2010). Wallerian degeneration, wld(s), and nmnat. *Annual Review of Neuroscience*, 33, 245-267.
- Conforti, L., Adalbert, R., & Coleman, M. P. (2007). Neuronal death: Where does the end begin? *Trends in Neurosciences*, 30, 159-166.
- Crish, S. D., & Calkins, D. J. (2011). Neurodegeneration in glaucoma: Progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience*, 176, 1-11.
- Crish, S. D., Dapper, J. D., MacNamee, S. E., Balam, P., Sidorova, T. N., Lambert, W. S., & Calkins, D. J. (2013). Failure of axonal transport induces a spatially coincident increase in astrocyte BDNF prior to synapse loss in a central target. *Neuroscience*, 229, 55-70.
- Crish, S. D., Sappington, R. M., Inman, D. M., Horner, P. J., & Calkins, D. J. (2010). Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 5196-5201.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 24, 55-99.
- Dervan, E. W., Chen, H., Ho, S. L., Brummel, N., Schmid, J., Toomey, D., Haralambova, M., Gould, E., Wallace, D.M., Prehn, J.H., O'Brien, C.J., & Murphy, D. (2010). Protein macroarray profiling of serum autoantibodies in pseudoexfoliation glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 2968-2975.
- Di Polo, A., Aigner, L. J., Dunn, R. J., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1998). Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3978-3983.
- Dibas, A., Yang, M. H., He, S., Bobich, J., & Yorrio, T. (2008). Changes in ocular aquaporin-4 (AQP4) expression following retinal injury. *Molecular Vision*, 14, 1770-1783.
- Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36, 180-190.
- Downs, J. C., Roberts, M. D., & Sigal, I. A. (2011). Glaucomatous cupping of the lamina cribrosa: A review of the evidence for active progressive remodeling as a mechanism. *Experimental Eye Research*, 93, 133-140.
- Dreyer, E. B. (1998). A proposed role for excitotoxicity in glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 7, 62-67.
- Dreyer, E. B., Pan, Z. H., Storm, S., & Lipton, S. A. (1994). Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *Neuroreport*, 5, 629-631.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 383-424.
- Eichler, W., Yafai, Y., Wiedemann, P., & Reichenbach, A. (2004). Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Müller) cells in hypoxia. *Neuroreport*, 15, 1633-1637.
- Elkabes, S., DiCicco-Bloom, E. M., & Black, I. B. (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *Journal of Neuroscience*, 16, 2508-2521.
- Elkington, A. R., Inman, C. B., Steart, P. V., & Weller, R. O. (1990). The structure of the lamina cribrosa of the human eye: An immunocytochemical and electron microscopical study. *Eye*, 4, 42-57.
- Emre, M., Orgul, S., Haufschild, T., Shaw, S. G., & Flammer, J. (2005). Increased plasma endothelin-1 levels in patients with progressive open angle glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*, 89, 60-63.
- Erb, C., & Heinke, M. (2011). Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *Frontiers in Bioscience*, 3, 1524-1533.
- Fan, W., Li, X., Wang, W., Mo, J. S., Kaplan, H., & Cooper, N. G. (2010). Early involvement of immune/inflammatory

response genes in retinal degeneration in DBA/2J mice. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 1, 23-41.

- Fernández-Durango, R., Ramírez, J. M., Triviño, A., Sánchez, D., Paraiso, P., García De Lacoba, M., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., Fernández-Cruz, A., & Gutkowska, J. (1991). Experimental glaucoma significantly decreases atrial natriuretic factor (ANF) receptors in the ciliary processes of the rabbit eye. *Experimental Eye Research*, 53, 591-596.
- Flammer, J., Haefliger, I. O., Orgul, S., & Resink, T. (1999). Vascular dysregulation: A principal risk factor for glaucomatous damage? *Journal of Glaucoma*, 8, 212-219.
- Flammer, J., Orgul, S., Costa, V. P., Orzalesi, N., Krieglstein, G. K., Serra, L. M., Renard, J.P., & Stefansson, E. (2002). The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 21, 359-393.
- Flammer, J., Pache, M., & Resink, T. (2001). Vasospasm, its role in the pathogenesis of diseases with particular reference to the eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20, 319-349.
- Flammer, J., & Mozaffarieh, M. (2007). What is the present pathogenetic concept of glaucomatous optic neuropathy? *Survey of Ophthalmology*, 52, S162-S173.
- Forrester, J. V. (2013). Bowman lecture on the role of inflammation in degenerative disease of the eye. *Eye*, 27, 340-352.
- Fourgeux, C., Bron, A., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., & Bretillon, L. (2011). 24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: From cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 496-499.
- Fu, C. T., & Sretavan, D. (2010). Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 51, 980-990.
- Gaasterland, D., & Kupfer, C. (1974). Reports: Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 13, 455-457.
- Gallego, B. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A. I., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Valiente-Soriano, F., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J.M.. (2012). IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 92.
- Gelatt, K. N., Peiffer, R., Gwin, R. M., Gum, G. G., & Williams, L. W. (1977). Clinical manifestations of inherited glaucoma in the beagle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 16, 1135-1142.
- Ghanem, A. A., Arafa, L. F., & El-Baz, A. (2010). Oxidative stress markers in patients with primary open-angle glaucoma. *Current Eye Research*, 35, 295-301.
- Gherghel, D., Griffiths, H. R., Hilton, E. J., Cunliffe, I. A., & Hosking, S. L. (2005). Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 877-883.
- Gherghel, D., Mroczkowska, S., & Qin, L. (2013). Reduction in blood glutathione levels occurs similarly in patients with primary-open angle or normal tension glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 3333-3339.
- Giebel, S. J., Menicucci, G., McGuire, P. G., & Das, A. (2005). Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Laboratory Investigation*, 85, 597-607.
- Gonzalez-Scarano, F., & Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 219-240.
- Good, T. J., & Kahook, M. Y. (2010). The role of endothelin in the pathophysiology of glaucoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14, 647-654.
- Grieshaber, M. C., Terhorst, T., & Flammer, J. (2006). The pathogenesis of optic disc splinter haemorrhages: A new hypothesis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 84, 62-68.
- Grieshaber, M. C., & Flammer, J. (2007). Does the blood-brain barrier play a role in glaucoma? *Survey of Ophthalmology*, 52, S115-S121.

- Grozdanic, S. D., Betts, D. M., Sakaguchi, D. S., Kwon, Y. H., Kardon, R. H., & Sonea, I. M. (2003). Temporary elevation of the intraocular pressure by cauterization of vortex and episcleral veins in rats causes functional deficits in the retina and optic nerve. *Experimental Eye Research*, 77, 27-33.
- Grus, F., & Sun, D. (2008). Immunological mechanisms in glaucoma. *Seminars in Immunopathology*, 30, 121-126.
- Grytz, R., Meschke, G., & Jonas, J. B. (2011). The collagen fibril architecture in the lamina cribrosa and peripapillary sclera predicted by a computational remodeling approach. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 10, 371-382.
- Grytz, R., Girkin, C. A., Libertiaux, V., & Downs, J. C. (2012). Perspectives on biomechanical growth and remodeling mechanisms in glaucoma. *Mechanics Research Communications*, 42, 92-106.
- Hayes, G. M., Woodroffe, M. N., & Cuzner, M. L. (1987). Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *Journal of the Neurological Sciences*, 80, 25-37.
- Hayreh, S. S. (1990). In vivo choroidal circulation and its watershed zones. *Eye*, 4, 273-289.
- Hernandez, M. R., Wang, N., Hanley, N. M., & Neufeld, A. H. (1991). Localization of collagen types I and IV mRNAs in human optic nerve head by in situ hybridization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(8), 2169-2177.
- Hernandez, M. R. (2000). The optic nerve head in glaucoma: Role of astrocytes in tissue remodeling. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(3), 297-321. doi:DOI: 10.1016/S1350-9462(99)00017-8
- Hernandez, M. R., & Pena, J. D. (1997). The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Archives of Ophthalmology*, 115, 389-395.
- Hernandez, M. R., Miao, H., & Lukas, T. (2008). Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Progress in Brain Research*, Volume 173, 353-373.
- Hogan, M. J., Alvarado, J. A., & Weddell, J. E. (1971). *Histology of the human eye: An atlas and textbook*. Toronto.: W.B. Saunders Company Ed.
- Holling, T. M., Schooten, E., & van Den Elsen, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men. *Human Immunology*, 65, 282-290.
- Hori, J., Joyce, N. C., & Streilein, J. W. (2000). Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3032-3042.
- Howell, G. R., Libby, R. T., Jakobs, T. C., Smith, R. S., Phalan, F. C., Barter, J.W., Barbay, J.M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Whitmore, A.V., Masland, R.H., & John, S. W. (2007). Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *Journal of Cell Biology*, 179, 1523-1537.
- Inman, D. M., & Horner, P. J. (2007). Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia*, 55, 942-953.
- Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325, 253-257.
- Jiang, L. Q., Jorquera, M., & Streilein, J. W. (1993). Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34, 3347-3354.
- Joachim, S. C., Reichelt, J., Berneiser, S., Pfeiffer, N., & Grus, F. H. (2008). Sera of glaucoma patients show autoantibodies against myelin basic protein and complex autoantibody profiles against human optic nerve antigens. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246, 573-580.
- John, S. W. (2005). Mechanistic insights into glaucoma provided by experimental genetics the cogan lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 2650-2661.
- John, S., Smith, R. S., Savinova, O. V., Hawes, N. L., Chang, B., Turnbull, D., Davisson, M., Roderick, T.H., & Heckenlively, J. R. (1998). Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39, 951-962.
- Johnson, E. C., Jia, L., Cepurna, W. O., Doser, T. A., & Morrison, J. C. (2007). Global changes in optic nerve head gene

- expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 3161-3177.
- Johnson, E. C., & Morrison, J. C. (2009). Friend or foe? resolving the impact of glial responses in glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 18, 341-353.
- Johnson, E. C., Doser, T. A., Cepurna, W. O., Dyck, J. A., Jia, L., Guo, Y., Lambert, W.S., & Morrison, J. C. (2011). Cell proliferation and interleukin-6–Type cytokine signaling are implicated by gene expression responses in early optic nerve head injury in rat glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 504-518.
- Johnson, E. C., Guo, Y., Cepurna, W. O., & Morrison, J. C. (2009). Neurotrophin roles in retinal ganglion cell survival: Lessons from rat glaucoma models. *Experimental Eye Research*, 88, 808-815.
- Johnson, T. V., Bull, N. D., & Martin, K. R. (2011). Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Experimental Eye Research*, 93, 196-203.
- Kalvin, N., Hamasaki, D., & Gass, J. (1966). Experimental glaucoma in Monkeys. I. Relationship between intraocular pressure and cupping of the optic disc and cavernous atrophy of the optic nerve. *Archives of Ophthalmology*, 76, 82-93.
- Kanamori, A., Nakamura, M., Nakanishi, Y., Yamada, Y., & Negi, A. (2005). Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Experimental Eye Research*, 81, 48-56.
- Kaplan, H. J., Stevens, T. R., & Streilein, J. W. (1975). Transplantation immunology of the anterior chamber of the eye I. an intra-ocular graft-vs-host reaction (immunogenic anterior uveitis). *Journal of Immunology*, 115, 800-804.
- Karageuzyan, K. G. (2005). Oxidative stress in the molecular mechanism of pathogenesis at different diseased states of organism in clinics and experiment. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4, 85-98.
- Kashiwagi, K., Ou, B., Nakamura, S., Tanaka, Y., Suzuki, M., & Tsukahara, S. (2003). Increase in dephosphorylation of the heavy neurofilament subunit in the monkey chronic glaucoma model. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 44, 154-159.
- Katagiri, K., Zhang-Hoover, J., Mo, J. S., Stein-Streilein, J., & Streilein, J. W. (2002). Using tolerance induced via the anterior chamber of the eye to inhibit Th2-dependent pulmonary pathology. *Journal of Immunology*, 169, 84-89.
- Kaushik, S., Pandav, S. S., & Ram, J. (2003). Neuroprotection in glaucoma. *Journal of Postgraduate Medicine*, 49, 90-95.
- Kawasaki, A., Otori, Y., & Barnstable, C. J. (2000). Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3444-3450.
- Kerrigan-Baumrind, L. A., Quigley, H. A., Pease, M. E., Kerrigan, D. F., & Mitchell, R. S. (2000). Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 741-748.
- Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 7, 338-353.
- Knott, A. B., & Bossy-Wetzel, E. (2009). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 541-554.
- Kolker, A. E., Moses, R. A., Constant, M. A., & Becker, B. (1963). The development of glaucoma in rabbits. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2, 316-321.
- Kompass, K., Agapova, O. A., Li, W., Kaufman, P., Rasmussen, C., & Hernandez, M. R. (2008). Bioinformatic and statistical analysis of the optic nerve head in a primate model of ocular hypertension. *BMC Neuroscience*, 9, 93.
- Kuchtey, J., Rezaei, K. A., Jaru-Ampornpan, P., Sternberg, P., Jr, & Kuchtey, R. W. (2010). Multiplex cytokine analysis reveals elevated concentration of interleukin-8 in glaucomatous aqueous humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 6441-6447.
- Kuehn, M. H., Kim, C. Y., Ostojic, J., Bellin, M., Alward, W. L., Stone, E. M., . . . Kwon, Y. H. (2006). Retinal synthesis

- and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Experimental Eye Research*, 83, 620-628.
- Kumpulainen, T., Dahl, D., Korhonen, L. K., & Nystrom, S. H. (1983). Immunolabeling of carbonic anhydrase isoenzyme C and glial fibrillary acidic protein in paraffin-embedded tissue sections of human brain and retina. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31, 879-886.
- Lee, M. K., & Cleveland, D. W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 187-217.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H. A., Martin, K. R., Valenta, D., Baumrind, L. A., & Pease, M. E. (2002). Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 402-410.
- Liao, H., Bu, W. Y., Wang, T. H., Ahmed, S., & Xiao, Z. C. (2005). Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 8316-8323.
- Libby, R. T., Anderson, M. G., Pang, I., Robinson, Z. H., Savinova, O. V., Cosma, I. M., Snow, A., Wilson, L.A., Smith, R.S., Clark, A.F., & John, S.W. (2005). Inherited glaucoma in DBA/2J mice: Pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Visual Neuroscience*, 22, 637.
- Lipton, S. A. (2001). Retinal ganglion cells, glaucoma and neuroprotection. *Progress in Brain Research*, 131, 712-718.
- Liu, B., & Neufeld, A. H. (2000). Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 30, 178-186.
- Lorber, B., Guidi, A., Fawcett, J. W., & Martin, K. R. (2012). Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma. *Neurobiology of Disease*, 45, 243-252.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., & Snyder, S. H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120, 227-237.
- Lundmark, P. O., Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., & Cardinali, D. P. (2006). Role of melatonin in the eye and ocular dysfunctions. *Visual Neuroscience*, 23, 853-862.
- Luo, C., Yang, X., Kain, A. D., Powell, D. W., Kuehn, M. H., & Tezel, G. (2010). Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial toll-like receptor signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 5697-5707.
- Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D., & Weinreb, R. N. (2004). Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 45, 4352-4358.
- Majsterek, I., Malinowska, K., Stanczyk, M., Kowalski, M., Blaszczyk, J., Kurowska, A. K., Kaminska, A., & Szaflik, J. (2011). Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Experimental and Molecular Pathology*, 90, 231-237.
- Martínez, A. (2013). Papel de las alteraciones hemodinámicas sistémicas y oculares en el glaucoma. *Revista Española de Glaucoma e Hipertensión Ocular*, 3, 6-16.
- Martinez, A., & Sanchez, M. (2005). Predictive value of colour doppler imaging in a prospective study of visual field progression in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 83,
- Maruyama, I., Ohguro, H., & Ikeda, Y. (2000). Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1657-1665.
- Medawar, P. (1948). Immunity to homologous grafted skin. III. the fate of skin homographs transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British Journal of Experimental Pathology*, 29, 58.
- Melamed, S., Ben-Sira, I., & Ben-Shaul, Y. (1980). Ultrastructure of fenestrations in endothelial choriocapillaries of the rabbit--a freeze-fracturing study. *British Journal of Ophthalmology*, 64, 537-543.
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93, 421-443.

- Minckler, D. S., Tso, M. O., & Zimmerman, L. E. (1976). A light microscopic, autoradiographic study of axoplasmic transport in the optic nerve head during ocular hypotony, increased intraocular pressure, and papilledema. *American Journal of Ophthalmology*, 82, 741-757.
- Mittag, T. W., Danias, J., Pohorenec, G., Yuan, H., Burakgazi, E., Chalmers-Redman, R., Podos, S.M., & Tatton, W. G. (2000). Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3451-3459.
- Moreno, M. C., Campanelli, J., Sande, P., Sanes, D. A., Keller Sarmiento, M. I., & Rosenstein, R. E. (2004). Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 803-812.
- Moreno, M. C., Sande, P., Marcos, H. A., de Zavalía, N., Keller Sarmiento, M. I., & Rosenstein, R. E. (2005a). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB Journal*, 19, 1161-1162.
- Moreno, M. C., Marcos, H. J. A., Oscar Croxatto, J., Sande, P. H., Campanelli, J., Jaliffa, C. O., Benozzi, J., & Rosenstein, R. E. (2005b). A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Experimental Eye Research*, 81, 71-80.
- Morgan, J. E. (2000). Optic nerve head structure in glaucoma: Astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye*, 14, 437-444.
- Morgan, S. C., Taylor, D. L., & Pocock, J. M. (2004). Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/akt and delta-notch signalling cascades. *Journal of Neurochemistry*, 90, 89-101.
- Morrison, J. C. (2006). Integrins in the optic nerve head: Potential roles in glaucomatous optic neuropathy (an american ophthalmological society thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 104, 453-477.
- Morrison, J. C., Cepurna Ying Guo, W. O., & Johnson, E. C. (2011). Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: Insights from rodent models of glaucoma. *Experimental Eye Research*, 93, 156-164.
- Morrison, J. C., Moore, C. G., Deppmeier, L. M., Gold, B. G., Meshul, C. K., & Johnson, E. C. (1997). A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Experimental Eye Research*, 64, 85-96.
- Munemasa, Y., & Kitaoka, Y. (2012). Molecular mechanisms of retinal ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6, 60.
- Nag, S. (2011). Morphology and properties of astrocytes. *Methods in Molecular Biology*, 686, 69-100.
- Nair, K. S., Hmani-Aifa, M., Ali, Z., Kearney, A. L., Salem, S. B., Macalinao, D. G., Cosma, I.M., Bouassida, W., Hakim, B., Benzina, Z., Soto, I., Söderkvist, P., Howell, G.R., Smith, R.S., Ayadi, H., John, S.V. (2011). Alteration of the serine protease PRSS56 causes angle-closure glaucoma in mice and posterior microphthalmia in humans and mice. *Nature Genetics*, 43, 579-584.
- Naskar, R., Vorwerk, C. K., & Dreyer, E. B. (2000). Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1940-1944.
- Naskar, R., Wissing, M., & Thanos, S. (2002). Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial in the retina of a rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 43, 2962-2968.
- Neetens, A. (1979). The vascular problem in glaucoma. In J. G. Bellows (Ed.), *Glaucoma: Contemporary international concepts* (pp. 49-99). USA: Masson Publishing USA.
- Neufeld, A. H. (1999a). Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 117, 1050-1056.
- Neufeld, A. H. (1999b). Nitric oxide: A potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, 43, S129-35.
- Neufeld, A. H., Hernandez, M. R., & Gonzalez, M. (1997a). Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Archives of Ophthalmology*, 115, 497-503.

- Neufeld, A. H., Hernandez, M. R., & Gonzalez, M. (1997b). Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head. *Archives of Ophthalmology*, 115, 497-503.
- Neufeld, A. H., Sawada, A., & Becker, B. (1999). Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9944-9948.
- Newman, E. A. (1986). The müller cell. In S. Federoff, & A. Vernadakis (Eds.), *Development, morphology and regional specialization of astrocytes* (pp. 149-171). Orlando: Academic Press, Inc.
- Newman, E. A. (2004). A dialogue between glia and neurons in the retina: Modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biology*, 1, 245-252.
- Nguyen, M. D., Julien, J. P., & Rivest, S. (2002). Innate immunity: The missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 216-227.
- Nickells, R. W. (1996). Retinal ganglion cell death in glaucoma: The how, the why, and the maybe. *Journal of Glaucoma*, 5, 345-356.
- Nieder Korn, J. Y. (1990). Immune privilege and immune regulation in the eye. *Advances in Immunology*, 48, 191-226.
- Nieder Korn, J. Y. (2002). Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Critical Reviews in Immunology*, 22, 13-46.
- Nieder Korn, J. Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: The lessons of immune privilege. *Nature Immunology*, 7(4), 354-359.
- Nieder Korn, J. Y., & Stein-Streilein, J. (2010). History and physiology of immune privilege. *Ocular Immunology and Inflammation*, 18, 19-23.
- Nieder Korn, J., Streilein, J. W., & Shadduck, J. A. (1981). Deviant immune responses to allogeneic tumors injected intracamerally and subcutaneously in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 20, 355-363.
- Nishikiori, N., Osanai, M., Chiba, H., Kojima, T., Mitamura, Y., Ohguro, H., & Sawada, N. (2007). Glial Cell-Derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy. *Diabetes*, 56, 1333-1340.
- Nixon, R. A., & Sihag, R. K. (1991). Neurofilament phosphorylation: A new look at regulation and function. *Trends in Neurosciences*, 14, 501-506.
- Noda, K., Ishida, S., Shinoda, H., Koto, T., Aoki, T., Tsubota, K., Oguchi, Y., Okada, Y., & Ikeda, E. (2005). Hypoxia induces the expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in retinal glial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 3817-3824.
- Nork, T. M., Ver Hoeve, J. N., Poulsen, G. L., Nickells, R. W., Davis, M. D., Weber, A. J., Vaegan, S., Sarks, S.H., Lemley, H.L., & Millecchia, L.L. (2000). Swelling and loss of photoreceptors in chronic human and experimental glaucomas. *Archives of Ophthalmology*, 118, 235-245.
- Ohta, K., Wiggert, B., Taylor, A. W., & Streilein, J. W. (1999). Effects of experimental ocular inflammation on ocular immune privilege. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 2010-2018.
- Osborne, N. N. (2008). Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: Focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Progress in Brain Research*, 173, 339-352.
- Panagis, L., Zhao, X., Ge, Y., Ren, L., Mittag, T. W., & Danias, J. (2011). Retinal gene expression changes related to IOP exposure and axonal loss in DBA/2J mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 7807-7816.
- Pant, H. C., & Veeranna. (1995). Neurofilament phosphorylation. *Biochemistry and Cell Biology*, 73, 575-592.
- Pease, M. E., McKinnon, S. J., Quigley, H. A., Kerrigan-Baumrind, L. A., & Zack, D. J. (2000). Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 764-774.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (1996). Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion

- cells. A quantitative in vivo study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 37, 489-500.
- Pena, J. D., Taylor, A. W., Ricard, C. S., Vidal, I., & Hernandez, M. R. (1999). Transforming growth factor beta isoforms in human optic nerve heads. *British Journal of Ophthalmology*, 83, 209-218.
- Pena, J. D. O., Agapova, O., Gabelt, B. T., Levin, L. A., Lucarelli, M. J., Kaufman, P. L., & Hernandez, M. R. (2001). Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 2303-2314.
- Perez-Alvarez, M. J., Isiegas, C., Santano, C., Salazar, J. J., Ramírez, A. I., Triviño, A., Ramírez, J.M., Albar, J.P., de la Rosa, E.J., & Prada, C. (2008). Vimentin isoform expression in the human retina characterized with the monoclonal antibody 3CB2. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 1871-1883.
- Pfrieger, F. W. (2002). Role of glia in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 486-490.
- Pfrieger, F. W. (2003). Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610, 271-280.
- Pinazo-Duran, M. D., Zanon-Moreno, V., Garcia-Medina, J. J., & Gallego-Pinazo, R. (2013). Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 98-107.
- Polazzi, E., & Contestabile, A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: From survival to neuropathology. *Reviews in the Neurosciences*, 13, 221-242.
- Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21777-21781.
- Prasanna, G., Krishnamoorthy, R., Clark, A. F., Wordinger, R. J., & Yorio, T. (2002). Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 2704-2713.
- Prasanna, G., Krishnamoorthy, R., & Yorio, T. (2011). Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Experimental Eye Research*, 93, 170-177.
- Qiao, H., Lucas, K., & Stein-Streilein, J. (2009). Retinal laser burn disrupts immune privilege in the eye. *American Journal of Pathology*, 174, 414-422.
- Quigley, H. A. (1999). Neuronal death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18, 39-57.
- Quigley, H. A. (2001). Selective citation of evidence regarding photoreceptor loss in glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 119, 1390-1391.
- Quigley, H. A., Addicks, E. M., Green, W. R., & Maumenee, A. E. (1981). Optic nerve damage in human glaucoma. II. the site of injury and susceptibility to damage. *Archives of Ophthalmology*, 99, 635-649.
- Quigley, H. A., & Anderson, D. R. (1977). Distribution of axonal transport blockade by acute intraocular pressure elevation in the primate optic nerve head. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 16, 640-644.
- Quigley, H. A., Dunkelberger, G. R., & Green, W. R. (1989). Retinal ganglion cell atrophy correlated with automated perimetry in human eyes with glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*, 107, 453-464.
- Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan-Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F., & Mitchell, R. S. (2000). Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3460-3466.
- Rader, J., Feuer, W. J., & Anderson, D. R. (1994). Peripapillary vasoconstriction in the glaucomas and the anterior ischemic optic neuropathies. *American Journal of Ophthalmology*, 117, 72-80.
- Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Rojas, B., Gallego, B. I., Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Ortín-Martínez, A., Avilés-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., & Ramírez, J. M. (2010). Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 5690-5696.

- Ramírez, J. M., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., & Triviño, A. (2001). Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 73, 601-615.
- Ramírez, J. M., & Salazar, J. J. (2008). Implications of astroglia in glaucomatous damage. [Implicación de la astroglia en el dano glaucomatoso]. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, 83, 339-342.
- Ramírez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A. I., & Salazar, J. J. (1998). Organization and function of astrocytes in human retina. In B. Castellano, B. Gonzalez & M. Nieto-Sampedro (Eds.), *Understanding glial cells* (pp. 47-62). Boston: Kluwer Academic Publishers.
- Ramírez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., & García-Sánchez, J. (1994). Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Research*, 34, 1935-1946.
- Ramírez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., & García-Sánchez, J. (1996). Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Research*, 36, 2029-2036.
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2010). Müller cells in the diseased retina. In A. Reichenbach, & A. Bringmann (Eds.), *Müller cells in the healthy and diseased retina* (pp. 215). New York: Springer.
- Ren, L., & Danias, J. (2010). A role for complement in glaucoma? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 703, 95-104.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11, 785-797.
- Ridet, J., & Privat, A. (2000). Reactive astrocytes, their roles in CNS injury, and repair mechanisms. *Advances in Structural Biology*, 6, 147-185.
- Rieck, J. (2013). The pathogenesis of glaucoma in the interplay with the immune system. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 2393-2409.
- Romano, C., Barrett, D. A., Li, Z., Pestronk, A., & Wax, M. B. (1995). Anti-rhodopsin antibodies in sera from patients with normal-pressure glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36, 1968-1975.
- Ruiz-Ederra, J., García, M., Hernández, M., Urcola, H., Hernández-Barbáchano, E., Araiz, J., & Vecino, E. (2005). The pig eye as a novel model of glaucoma. *Experimental Eye Research*, 81, 561-569.
- Ryan, S. J., Hinton, D. R., & Sadda, S. R. (2013). *Retina: Vol. 1, retinal imaging and diagnostics. basic science and translation to therapy*. London, [etc]: Saunders-Elsevier.
- Salazar, J. J. (1994). *Glioarquitectura de la cabeza del nervio óptico humano estudio inmunohistoquímico con anti-PGFA*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F. J., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., de la Villa, P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino swiss mice. *Molecular Vision*, 15, 2578-2598.
- Sappington, R. M., & Calkins, D. J. (2008). Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFκB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 3004-3017.
- Sappington, R. M., Carlson, B. J., Crish, S. D., & Calkins, D. J. (2010). The microbead occlusion model: A paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 51, 207-216.
- Sasaki, T., Watanabe, W., Muranishi, Y., Kanamoto, T., Aihara, M., Miyazaki, K., Tamura, H., Saeki, T., Oda, H., Souchelnytskyi, N., Souchelnytskyi, S., Aoyama, H., Honda, Z., Furukawa, T., Mishima, H.K., Kiuchi, Y., & Honda, H., N. (2009). Elevated intraocular pressure, optic nerve atrophy, and impaired retinal development in ODAG transgenic mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 242-248.
- Satilmis, M., Orgul, S., Doubler, B., & Flammer, J. (2003). Rate of progression of glaucoma correlates with retrobulbar circulation and intraocular pressure. *American Journal of Ophthalmology*, 135, 664-669.
- Sawada, A., & Neufeld, A. H. (1999). Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure.

Experimental Eye Research, 69, 525-531.

- Schlamp, C. L., Li, Y., Dietz, J. A., Janssen, K. T., & Nickells, R. W. (2006). Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neuroscience*, 7, 66.
- Senatorov, V., Malyukova, I., Fariss, R., Wawrousek, E. F., Swaminathan, S., Sharan, S. K., & Tomarev, S. (2006). Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 26, 11903-11914.
- Shao, H., Kaplan, H. J., & Sun, D. (2007). Major histocompatibility complex molecules on parenchymal cells of the target organ protect against autoimmune disease. *Chemical Immunology and Allergy*, 92, 94-104.
- Shareef, S. R., Garcia-Valenzuela, E., Salierno, A., Walsh, J., & Sharma, S. C. (1995). Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Experimental Eye Research*, 61, 379-382.
- Sharma, R. K. (2007). Molecular neurobiology of retinal degeneration. In A. Lajtha, & D. Johnson (Eds.), *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology* (pp. 47-92) Springer US.
- Siesky, B. A., Harris, A., Amireskandari, A., & Marek, B. (2012). Glaucoma and ocular blood flow: An anatomical perspective. *Expert Review of Ophthalmology* 7, 325-340.
- Sigal, I. A. (2009). Interactions between geometry and mechanical properties on the optic nerve head. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 50, 2785-2795.
- Sigal, I. A., Bilonick, R. A., Kagemann, L., Wollstein, G., Ishikawa, H., Schuman, J. S., & Grimm, J. L. (2012). The optic nerve head as a robust biomechanical system. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 2658-2667.
- Sigal, I.A., Flanagan, J.G., Tertinegg, I., & Ethier, C. R. (2010). 3D morphometry of the human optic nerve head. *Experimental Eye Research*, 90, 70-80.
- Smith, R. S., Zabaleta, A., Kume, T., Savinova, O. V., Kidson, S. H., Martin, J. E., Nishimura, D.Y., Alward, W.L., Hogan, B.L., & John, S. W. (2000). Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development. *Human Molecular Genetics*, 9, 1021-1032.
- Sofroniew, M., & Vinters, H. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35.
- Soto, I., Oglesby, E., Buckingham, B. P., Son, J. L., Roberson, E. D., Steele, M. R., Inman, D.M., Vetter, M.L., Horner, P.J., & Marsh-Armstrong, N. (2008). Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *The Journal of Neuroscience*, 28(2), 548-561.
- Soto, I., Pease, M. E., Son, J. L., Shi, X., Quigley, H. A., & Marsh-Armstrong, N. (2011). Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 434-441.
- Spitznas, M. (1974). The fine structure of the chorioretinal border tissues of the adult human eye. *Advances in Ophthalmology*, 28, 78-174.
- Spitznas, M., & Reale, E. (1975). Fracture faces of fenestrations and junctions of endothelial cells in human choroidal vessels. *Investigative Ophthalmology*, 14, 98-107.
- Stasi, K., Nagel, D., Yang, X., Wang, R. F., Ren, L., Podos, S. M., Mittag, T., & Danias, J. (2006). Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 1024-1029.
- Steele, M. R., Inman, D. M., Calkins, D. J., Horner, P. J., & Vetter, M. L. (2006). Microarray analysis of retinal gene expression in the DBA/2J model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 977-985.
- Streilein, J.W. (1987). Immune regulation and the eye: A dangerous compromise. *The FASEB Journal*, 1, 199-208.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nature Reviews Immunology*, 3, 879-889.
- Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Fong Ng, T., & Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina

and pigment epithelium transplants. *Vision Research*, 42, 487-495.

- Sucher, N. J., Lipton, S. A., & Dreyer, E. B. (1997). Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Research*, 37, 3483-3493.
- Tezel, G. (2013). Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 23-31.
- Tezel, G., Chauhan, B. C., LeBlanc, R. P., & Wax, M. B. (2003). Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 3025-3033.
- Tezel, G., Hernandez, M. R., & Wax, M. B. (2000). Immunostaining of heat shock proteins in the retina and optic nerve head of normal and glaucomatous eyes. *Archives of Ophthalmology*, 118, 511-518.
- Tezel, G., Li, L. Y., Patil, R. V., & Wax, M. B. (2001). TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 1787-1794.
- Tezel, G., Seigel, G., & Wax, M. (1998). Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 39, 2277-2287.
- Tezel, G., & Wax, M. B. (2000a). Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 20, 8693-8700.
- Tezel, G., & Wax, M. B. (2000b). The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3552-3562.
- Tezel, G., & Wax, M. B. (2007). Glaucoma. *Chemical Immunology and Allergy*, 92, 221-227.
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Cai, J., & Powell, D. W. (2012). An astrocyte-specific proteomic approach to inflammatory responses in experimental rat glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53, 4220-4233.
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Kain, A. D., Powell, D. W., Kuehn, M. H., & Kaplan, H. J. (2010). Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 5071-5082.
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Peng, Y., Sun, S. L., & Sun, D. (2007). Mechanisms of immune system activation in glaucoma: Oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48, 705-714.
- Tezel, G., Yang, J., & Wax, M. B. (2004). Heat shock proteins, immunity and glaucoma. *Brain Research Bulletin*, 62(6), 473-480.
- Tezel, G., & the Fourth ARVO/Pfizer Ophthalmics Research Institute Conference, Working Group. (2009). The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 50, 1001-1012.
- Thanos, C., & Emerich, D. (2005). Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 1443-1452.
- Törnquist, P. (1979). Capillary permeability in cat choroid, studied with the single injection technique (II). *Acta Physiologica Scandinavica*, 106, 425-430.
- Tout, S., Chan-Ling, T., Hollander, H., & Stone, J. (1993). The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*, 55, 291-301.
- Triviño, A., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Rojas, B., De Hoz, R., & Ramírez, J. M. (2005). Retinal changes in age-related macular degeneration. In O. R. Ioseliane (Ed.), *Focus on eye research* (pp. 1-37). New York: Nova science publishers.
- Triviño, A., Ramírez, J. M., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., & García-Sánchez, J. (1997). Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Research*, 37, 1707-1711.

- Triviño, A., Ramírez, J. M., Salazar, J. J., Ramírez, A. I., & García-Sánchez, J. (1996). Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Research*, 36, 2015-2028.
- Tse, M. T. (2012). Axon degeneration: A new pathway emerges. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 516.
- Ueda, J., Sawaguchi, S., Hanyu, T., Yaoeda, K., Fukuchi, T., Abe, H., & Ozawa, H. (1998). Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of india ink. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 42, 337-344.
- Varela, H. J., & Hernandez, M. R. (1997). Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *Journal of Glaucoma*, 6, 303-313.
- Vidal-Sanz, M., Aviles-Trigueros, M., Whiteley, S. J., Sauve, Y., & Lund, R. D. (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: Anatomical and functional studies. *Progress in Brain Research*, 137, 443-452.
- Vorwerk, C. K., Gorla, M. S., & Dreyer, E. B. (1999). An experimental basis for implicating excitotoxicity in glaucomatous optic neuropathy. *Survey of Ophthalmology*, 43, S142-50.
- Walsh, M. M., Yi, H., Friedman, J., Cho, K., Tserentsoodol, N., McKinnon, S., Searle, K., Yeh, A., & Ferreira, P. A. (2009). Gene and protein expression pilot profiling and biomarkers in an experimental mouse model of hypertensive glaucoma. *Experimental Biology and Medicine*, 234, 918-930.
- Wang, L., Cioffi, G. A., Cull, G., Dong, J., & Fortune, B. (2002). Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43, 1088-1094.
- Wang, R., Schumer, R. A., Serle, J. B., & Podos, S. M. (1998). A comparison of argon laser and diode laser photocoagulation of the trabecular meshwork to produce the glaucoma monkey model. *Journal of Glaucoma*, 7, 45-49.
- Wang, X., Ng, Y. K., & Tay, S. S. (2005). Factors contributing to neuronal degeneration in retinas of experimental glaucomatous rats. *Journal of Neuroscience Research*, 82, 674-689.
- Wang, X., Tay, S., & Ng, Y. K. (2000). An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Experimental Brain Research*, 132, 476-484.
- Wax, M. B., & Tezel, G. (2002). Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: Diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, 26, 45-55.
- Wax, M. B., & Tezel, G. (2009). Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. *Experimental Eye Research*, 88, 825-830.
- Wax, M. B., Tezel, G., Yang, J., Peng, G., Patil, R. V., Agarwal, N., Sappington, R.M., & Calkins, D. J. (2008). Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *Journal of Neuroscience*, 28, 12085-12096.
- Weber, A. J., & Zelenak, D. (2001). Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *Journal of Neuroscience Methods*, 111, 39-48.
- Weigelin, E. (1972). The blood circulation of the retina and the uvea. *Advances in Ophthalmology*, 25, 2-27.
- Wenkel, H., Chen, P. W., Ksander, B. R., & Streilein, J. W. (1999). Immune privilege is extended, then withdrawn, from allogeneic tumor cell grafts placed in the subretinal space. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40, 3202-3208.
- Wenkel, H., & Streilein, J. W. (2000). Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 3467-3473.
- Whitmore, A. V., Libby, R. T., & John, S. W. (2005). Glaucoma: Thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Progress in Retinal and Eye Research*, 24, 639-662.
- Wilbanks, G., & Streilein, J. (1990). Distinctive humoral immune responses following anterior chamber and intravenous administration of soluble antigen. evidence for active suppression of IgG2-secreting B lymphocytes. *Immunology*,

- Wilson, J. X. (1997). Antioxidant defense of the brain: A role for astrocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75, 1149-1163.
- WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M., & Wheeler, L. A. (2001). Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42, 2849-2855.
- Yan, X., Tezel, G., Wax, M. B., & Edward, D. P. (2000). Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Archives of Ophthalmology*, 118, 666-673.
- Yang, J., Yang, P., Tezel, G., Patil, R. V., Hernandez, M. R., & Wax, M. B. (2001). Induction of HLA-DR expression in human lamina cribrosa astrocytes by cytokines and simulated ischemia. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 42, 365-371.
- Yang, X., Luo, C., Cai, J., Powell, D. W., Yu, D., Kuehn, M. H., & Tezel, G. (2011). Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to TNF- α /TNFR1 signaling in the glaucomatous human retina. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 52, 8442-8454.
- Yildirim, O., Ates, N. A., Ercan, B., Muslu, N., Unlu, A., Tamer, L., Atik, U., & Kanik, A. (2005). Role of oxidative stress enzymes in open-angle glaucoma. *Eye*, 19, 580-583.
- Yuan, L., & Neufeld, A. H. (2000). Tumor necrosis factor-alpha: A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia*, 32, 42-50.
- Yuan, L., & Neufeld, A. H. (2001). Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *Journal of Neuroscience Research*, 64, 523-532.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (1997). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular Psychiatry*, 2, 300-310.
- Zhang, J., & Snyder, S. H. (1995). Nitric oxide in the nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 213-233.
- Zhong, Y. S., Leung, C. K., & Pang, C. P. (2007). Glial cells and glaucomatous neuropathy. *Chinese Medical Journal*, 120, 326-335.
- Zhou, Y., Grinchuk, O., & Tomarev, S. I. (2008). Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49, 1932-1939.